



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Université Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie/Analyse Protéomique et Santé

Intitulé :

Effet hépato-protecteur d'une lectine purifiée à partir de la plante *Ephedra alata* sur l'inflammation induite par LPS .

Présenté et soutenu par :

- KHENIOUA Nour El Houda

Le : 05-06-2016

- NABTI Amina

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : MECHAKRA A. (Pr-UFM Constantine)

Rapporteur : NECIB Y. (Pr-UFM Constantine)

Examineur : BAHI A. (MA - UFM Constantine)

Année universitaire

2015 – 2016

Remerciements

Au terme de ce travail, on tient à remercier en premier lieu à '**ALLAH**' le bon dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné force, volonté, et patience qui nous ont permis d'achever cette modeste étude.

En seconde lieu, nous tenons à remercier notre encadreur : monsieur **NECIB Y.** qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail et pour toute la compréhension qu'il a montré, sa disponibilité et sa patience et son aide durant toute la période du travail

Un grand merci accompagné de notre profond respect et notre gratitude envers Mm **BAHI A.** maitre-assistante à Université des Frères Mentouri Constantine pour son aide et ses orientations, Pour tous les conseils et l'attention qu'elle nous a prodigué tout au long de la réalisation de ce travaille, et Pour sa gentillesse .

Nos remerciements vont aussi aux membres de notre jury de mémoire : A notre professeur et présidente du jury Madame **MECHAKRA. A** C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez accepté de présider notre jury de mémoire.

MERCI

Je dédie ce modeste travail

À mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à mes frères :Sofiane Et Noufel Et A Mes Sœurs :Imen Et Amira

À mes chères amies : Safia, Khadidja , Maroua.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Nour el houda

Dédicaces

*En premier lieu je remercie Allah le tout puissant de m'avoir
donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.*

Je dédie ce mémoire à

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices
consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie,
reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon
éternelle gratitude.*

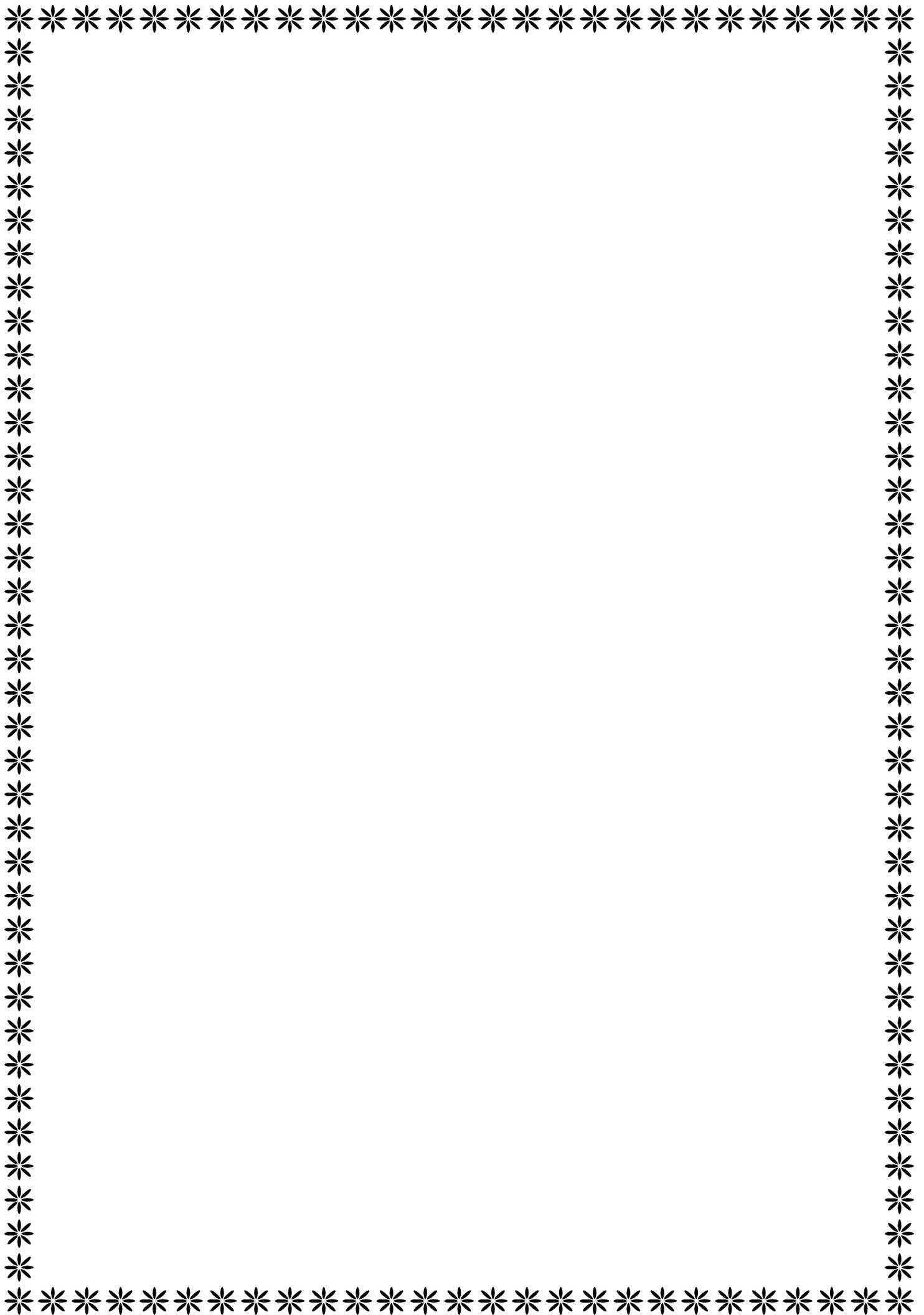
*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de
privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail
porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de
toi.*

A mes chers frères : Mohamed et Sofiane et ma sœur : Amel

*A tous mes amis et camarades et à toute personne que j'ai aimée et respectée, à tous les
étudiants de la deuxième année master «analyse protéomique et santé »*

Et à tous qui connaît « Amina »

Amina



Résumé

L'étude visait à évaluer le rôle hépato-protecteur possible de lectine partiellement purifiée de la plante *Ephedra alata* sur l'inflammation induite par le lipopolysaccharide chez le rat, en utilisant des approches biochimiques. Les effets de la lectine *d'Ephedra alata* sur le stress oxydatif induit par LPS ont été évalués par les niveaux de la peroxydation lipidique hépatique et niveaux GSH, activités SOD, et des paramètres de la capacité anti-oxydante plasmatique : DPPH et vitamine c.

A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable de poids Corporel des rats contaminés au LPS et une augmentation du poids absolu et relatif du foie.

Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques Caractérisés surtout, par une augmentation de la concentration plasmatique du CRP, les tranaminases et PAL sérique chez les rats contaminés par LPS par rapport aux animaux témoins. alors que, LPS a aussi induit un stress oxydatif, comme l'indiquent par la diminution de GSH, SOD, ainsi que de l'augmentation du niveau de la peroxydation lipidique. les paramètres anti-oxydantes DPPH, vitamine c ont diminué ; L'addition combinée de lectine et Diclofenac a amélioré les paramètres biochimiques et surtout celle de la fonction hépatique.

Aussi, les résultats ont montré clairement des altérations de structures des tissus étudiés en comparaison avec les témoins, avec veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irrégulières, inflammation et nécrose hépatique .. Alors que pour les lots traités au LPS et traités par lectine ou diclofenac des congestions vasculaires avec veine centrolobulaire dilatée ont été notées mais en générale l'architecture semble intacte.

En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition au LPS a des effets toxiques sur les paramètres mentionnés précédemment, la supplémentation de lectine et diclofenac combinée à améliorer certains paramètres et diminuer les altérations histologiques par la protection contre les effets toxiques du LPS.

Mots-clés : lipopolysaccharide, stress oxydant, *Ephedra alata*, l'inflammation, rats, le foie.

Abstract

The aim of this study was to assess the possible hepato-protective role of lectin partially purified from the plant *Ephedra alata* on inflammation induced by lipopolysaccharide in rats, using biochemical approaches. The effects of the lectin of *Ephedra alata* on LPS-induced oxidative stress were assessed by levels of hepatic lipid peroxidation and levels of GSH, SOD activity and plasma antioxidant capacity parameters: DPPH and vitamin c .

from the analysis of our results, there is a considerable decrease of body weight of rats contaminated with LPS and an increase in absolute and relative liver weights.

The results showed also a notable changes in biochemical parameters characterized above by an increase in plasma levels of CRP, tranaminases and PAL in rats contaminated with LPS compared with control animals. While LPS also induced oxidative stress, as indicated by the decrease of GSH, SOD, as well as the increase in the level of lipid peroxidation. And the decrease of antioxidant parameters : DPPH, vitamin c ; The combined addition of lectin and Diclofenac improved the biochemical parameters and especially that of liver function.

Also, the results showed a clear alterations in structures of the studied tissues when compared with controls, with dilated centrilobular vein, irregular hepatocytes, inflammation and hepatic necrosis. While for batches treated with LPS combined with lectin or diclofenac a vascular congestion with centrilobular dilated vein were noted but in general the architecture seems intact.

In conclusion, this study has shown that the exposure to LPS has toxic effects on the parameters mentioned previously, the supplementation combined with lectin and diclofenac improving some parameters and decrease the histological alterations by the protection against the toxic effects of LPS.

Key words: lipopolysaccharide, oxidative stress, *Ephedra alata*, inflammation, rats, liver.

الملخص

ان الهدف من هذا العمل هو دراسة الاثار الوقائية الكبدية للكتين المستخلص جزئيا من نبتة *Ephedra alata* حول الالتهاب المحفز بواسطة Lipopolysaccharide عند الفئران باستعمال مناهج بيو كيميائية . ان تأثير لكتين *Ephedra alata* على الاجهاد التأكسدي عند الفئران المعاملة ب LPS تم معاينته من خلال مستويات peroxydation lipidique الكبدية و مستويات ال GSH و نشاط SOD و مؤشرات القدرة ضد تأكسدية DPPH و الفيتامين C .

من النتائج المتحصل عليها نلاحظ ان هناك انخفاض في معدل النمو عند الفئران المحرصة ب LPS وزيادة في الوزن النسبي للكبد . النتائج اظهرت ايضا تغيرات ملموسة في مستوى المؤشرات البيوكيميائية و المتمثلة في ارتفاع التركيز البلازمي ل CRP و PAL, AZAT,ALAT , في مصل الفئران المعاملة ب LPS مقارنة بالحيوانات الشاهدة .

اثر LPS ايضا على الاجهاد التأكسدي حيث سجل انخفاض في مستويات GSH و SOD وارتفاع في peroxydation lipidique مع تسجيل انخفاض في DPPH و vitamine c كما ان اضافة LPS و اللكتين معا حسنت ايضا مستوى بعض هذه المؤشرات و اعادتها الى المستوى العادي .

كما لوحظ تأثير سمي واضح لل LPS على انسجة الكبد ادى الى حدوث تمزق للأغشية الخلوية للخلايا الكبدية مع حدوث تشمعها .

وعموما ما يمكن استنتاجه من هذه الدراسة ان LPS له تأثير سام على المؤشرات السالفة الذكر و ان اضافة اللكتين و diclofenac تؤدي لتعديل بعض هذه المؤشرات و تخفيض الاضرار على مستوى الانسجة عن طريق الحماية من التأثيرات السمية ل LPS .

الكلمات المفتاحية : Ips , الاجهاد التأكسدي , *Ephedra alata* , الالتهاب , الفئران , الكبد

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

Section I : contexte bibliographique.

Chapitre 1 : Les lectines

1. Définition des lectines	3
2. Historique.....	4
3. La Structure des lectines	5
3.1 Les lectines simples.....	5
3.2 Les lectines en mosaïque	5
3.3 Les assemblages macromoléculaires	6
4. Les sites de liaisons des lectines.....	6
5. Les lectines dans le monde vivant.....	6
5.1 Les lectines des microorganismes.....	7
5.1.1 Les lectines virales.....	7
5.1.2 Les lectines de champignon	7
5.1.3 Les lectines bactériennes	8
5.2 Les lectines animales	8
5.3 Les lectines présentes chez les plantes.....	8
6. Classification des lectines végétales	8
6.1 Selon la Spécificité osidique	8
6.2 Selon la structure quaternaire.....	10
6.2.1 Les mérolectines.....	10
6.2.2 Les hololectines	10
6.2.3 Les chimérolectines.....	10

6.2.4 Les superlectines.....	10
7. Rôle des lectines dans les organismes vivants.....	11
8. Propriétés Biologiques des lectines.....	12
8.1.Liaison avec les sucres.....	12
8.2.L'agglutination des cellules.....	12
8.3.Effets mimétiques des hormones.....	12
8.4.Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses.....	12
8.5.Activité mitogène.....	13
8.6. propriété antibactérienne.....	13.
8.7.Actions antivirales.....	13.
9. Utilisation des lectines.....	14
9.1.Dans le domaine biomédical.....	14
9.1.1. Hématologie.....	14
9.1.2. Immunologie.....	14
9.1.3. Biologie cellulaire.....	14
9.1.4. Cancérologie.....	14
9.2.Dans le domaine agronomique.....	16
9.3 En biochimie et protéomique.....	16
Chapitre 2 : les médicaments anti-inflammatoires	
1. Inflammation	17
1.1. Définition de l'inflammation.....	17
1.2.Définition de LPS.....	17
1.3.La Structure du LPS.....	18
1.4.La Physiopathologie du LPS.....	19
2. Les anti-inflammatoires.....	19
2.1 .Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	19
2.2. Anti-inflammatoire non stéroïdiens.....	20
2.2.1. Le diclofénac	
2.2.1.1. Les propriétés du diclofenac.....	21
2.2.1.2.la pharmacocinétique du diclofenac.....	22
2.2.1.3. La Pharmacodynamie du diclofénac.....	23
2.3.Les Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	23
2.3.1. Description botanique d' <i>Ephedra alata</i>	23

2.3.2 Classification scientifique <i>d'Ephedra alata</i>	24
2.3.3. Propriétés médicinales <i>d'Ephedra alata</i>	25

Chapitre III. Le stress oxydant

1. Définition.....	26
2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	27
3. Les cibles biologiques du stress oxydant.....	28
3.1. Les lipides.....	29
3.2. Les protéines.....	30
3.3. Les acides nucléiques.....	31
4. Systèmes de défenses antioxydants.....	33
4.1. systèmes enzymatiques.....	33
a). La Superoxyde dismutase.....	34
b). La catalase	34
c). Les glutathions peroxydases et réductases	34
4.2. systèmes antioxydants non enzymatiques.....	35
4.2.1. Le Glutathion réduit (GSH).....	35
4.2.2. La Vitamine E.....	35
4.2.3. La Vitamine C.....	35

Section II : Matériel et méthodes

1. Matériels et méthodes des tests biologiques

1.1. Matériel biologique et conditions d'élevage.....	36
1.2. Le Traitement des rats	37
1.3. Sacrifices et prélèvements du foie	38
1.3.1. Prélèvement sanguin.....	38
1.3.2 Prélèvement du foie.....	38
1.4. Les Méthodes de dosage.....	40
1.4.1. Dosage des paramètres biochimiques	40
1.4.2. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique	40
1.4.3. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique	40
• Dosage de la vitamine C	40
• Dosage de radical DPPH in vivo	40
1.4.4. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire.....	41

• Préparation de l'homogénat.....	41
• Dosage du glutathion.....	41
• Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD).....	41
• Dosage des protéines tissulaire.....	41
1.5. L'étude histologique.....	42
1.6. Analyse statistique.....	42

Section III : Résultats et discussion .

1. Influence du traitement sur les variations du poids corporel et pondérales des organes	43
1.1. Résultats.....	43
1.2. Discussion.....	43
2. Influence du traitement sur les variations de quelque Paramètres biochimiques	44
2.1. Résultats.....	44
2.2. Discussion.....	44
3. Influence du traitement sur les variations de l'activité sérique de quelques Marqueurs enzymatiques	45
3.1. Résultats	45
3.2. Discussion.....	47
4. Influence du traitement sur la capacité antioxydante plasmatique.....	47
4.1. Résultats	47
4.2. Discussion.....	49
5. Influence du traitement sur les variations des paramètres du stress oxydant.....	50
5.1. Résultats	50
5.2. Discussion.....	51
6. Influence du traitement sur les variations histologiques.....	54
6.1. Résultats	54
6.1. discussion.....	56
Conclusion et perspectives.....	57
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations dpph pal

ACTH : adrénocorticotrophine

ADN : Acide 2-désoxyribonucléique

ALT : alanine aminotransférase.

AST : aspartate aminotransférase

Ca²⁺ : ion calcium

COX : Cyclo-oxygénase

CRP : protéine c réactive

Cu⁺² : Cation cuivreux

D : diclofénac

DNTB : acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ethylenediaminetetra acetic acid

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent assay

Fe²⁺ : ion fer

Fuc: L-fucose

Gal: galactose

Gal, GalNAc: D-galactose, N-acétylgalactosamine

Glc, GLCNAc: D-glucose, N-acétylglucosamine

GR: globule rouge

GSH-Px: Glutathione peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSH/GSSG : Glutathion réduit/oxydé

GSSG : Glutathion oxydé

HSP: Protéine de stress (Heat Shock Protein)

IP: intra péritonéal

KDa: kilo Dalton

L: lectine

LDL: Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)

LOO°: Radical peroxyde

LOOH: Hydroperoxyde

Man: D-mannose

MDA: Malondialdehyde

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

O₂ : Dioxygène

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH⁻ : Ion hydroxyde

OH° : Radical hydroxyle

PAL : phosphatase alcaline

PGE : prostaglandine

pH : Potentiel d'hydrogènétase alcaline

RL : Radicaux libres

RIP : Ribosomes inactivant les protéines

ROO° : Radical peroxyde

SOD : Superoxyde dismutase

TBA: Acide thiobarbiturique

TCA : Trichloroacétique

TLR4 : Toll Like Receptor 4

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

WGA : wheat germ agglutinin

Liste des figures

Nº	Figure	Page
1	Représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de <i>Canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannoside	5
2	Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique	5
3	Représentation schématique de différents fimbriaux de la bactérie <i>Escherichia coli</i>	6
4	Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides	7
5	la paroi des bactéries Gram négative	18
6	structure schématique de la molécule de lipopolysaccharide	19
7	Mécanisme d'action des AINS	21
8	Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac	22
9	<i>Ephedra alata alenda</i>	24
10	Stress oxydant	26
11	Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	28
12	Réactions de la peroxydation lipidique	30
13	Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire	31
14	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires	32
15	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	33
16	Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique	34
17	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	39
18	Variation de l'activité enzymatique de CRP chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement.	45
19	Variation de l'activité enzymatique de ASAT, ALAT et PAL chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement.	46

20	Variation de la capacité anti-oxydante plasmatique vis-à-vis DPPH, la concentration plasmatique de vitamines C chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement.	48
21	variation de taux de GSH hépatique, MDA hépatique, plasmatique et l'activité enzymatique de SOD, hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement..	50
22	les coupes histologiques du foie	55

Liste des tableaux

Nº	Tableau	Page
1	les lectines et leurs applications	3
2	l'historique de découverte des lectines	4
3	La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines	9
4	Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant	11
5	Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical	15
6	Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment	37
7	Variation de poids corporel (PC) et pondérales du foie (g) chez les rats témoins et traités après 7journées du traitement.	43

Introduction

Introduction

Les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides. Elles interviennent dans divers processus biologiques, les Lectines ont attiré une grande attention dans la recherche en raison de leur large gamme d'activités biologiques dans l'agglutination des cellules et en tant que molécules anti-tumorales, immunomodulateurs, antifongiques, antiprolifératives et antivirales aussi bien que puissants antioxydants qui pourraient inhiber la peroxydation lipidique et piéger les radicaux libres (Azevedo *et al.*, 2001).

La réaction inflammatoire est une réponse naturelle de l'organisme face à une agression. Elle peut relever de nombreuses causes : infectieuses (bactérienne, virale, parasitaire), immunologiques, tumorales, traumatismes physiques (intervention chirurgicale, brûlure), chimiques (microcristaux), ou nécrose tissulaire (Miossec Pierre, 2003). Cependant, la réponse inflammatoire est une des sources des radicaux libres.

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense. Dans les circonstances normales, la balance antioxydants / pro oxydants est en équilibre si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (Favier., 2003).

En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Par ailleurs, beaucoup d'études s'intéressent actuellement à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle, parmi lesquelles on a choisi, la plante d'*Ephedra alata*, cette plante est beaucoup utilisée en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies telle que la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (Ould El Hadj *et al.*, 2003). Le diabète (Ghourri *et al.*, 2013). Surtout dans les traitements des cancers.

Notre travail a pour but d'explorer l'impact du LPS sur certains aspects pondéraux, et biochimiques et histologique chez les rats *Wistar*, et d'évaluer les effets des lectines extraites

a partir de la plante d'*Ephedra alata* , afin d'établir si cette lectine peut protéger l'organisme contre les effets cytotoxiques du LPS.

Dans ce contexte, notre étude tend à mettre en évidence les effets protectifs des lectines d'*Ephedra alata* sur une agression par LPS en évaluant les aspects suivants :

- Etude de la variation pondérale du foie.
- Mesure de la concentration de quelques paramètres biochimiques plasmatiques.
- Etude de la capacité antioxydante plasmatique.
- Appréciation des capacités de détoxification à travers le dosage de quelques paramètres du stress oxydant.
- Etude des Coupes histologiques du foie.

Section I :
Contexte
bibliographique.

Chapitre 1

les lectines

1. Définition des lectines

Le mot *lectine* dérive du verbe latin “*legere*” qui veut dire « sélectionner » ou « choisir »
Les lectines sont des protéines d’origine non-immune qui se lient spécifiquement et de façon non covalente et réversible aux sucres et ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats (**Kocourek, 1981**).

Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d’agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule, ce qui permet d’expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l’agglutination de cellules diverses (**Liener et al., 1986**).

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d’organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux présentes dans tout le règne vivant avec une très grande diversité structurale et jouent des rôles variés dans la vie sociale des cellules et les interactions avec l’environnement (**Sharon and Lis 2004**) ; Quelques lectines importantes sont énumérées dans le tableau 1

Tableau 01 : les lectines et leurs applications (**Bothan et Weil, 2011**).

Lectines	Exemple et commentaire
Lectine de légumes	Concanavalline A, lectine de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l’étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine
Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d’E. coli et toxine du choléra
Hémagglutinine de virus de la grippe	Responsable de l’attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectines animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

2. Historique

Tableau 2 : l'historique de découverte des lectines (**Renato, et coll. 1991**).

Année	Auteur	Découvertes
1888	Stillmark	Activité hemagglutinante de la graine de Ricinus communis Toxicite de la graine de Croton triglium
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'"hémagglutinine
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera / Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à Hémagglutinines
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'Escherichia coli

3. La Structure des lectines

Du point de vue structural, on classe les lectines en trois grandes classes selon leur topologie :

3.1- Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement n'excède pas 40 kDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines, une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose. (Lenka, 2006) (figure1)

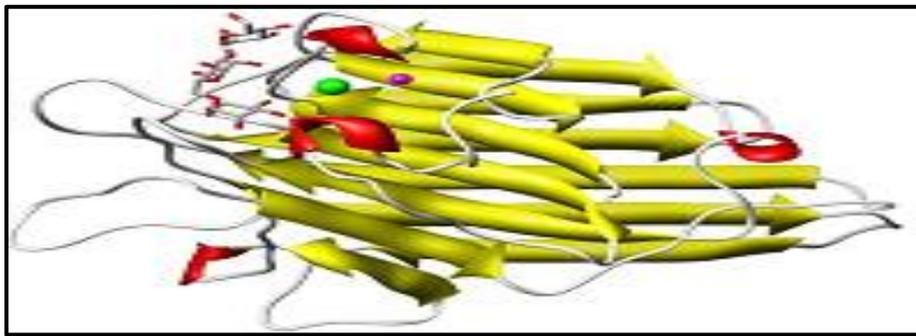


Figure 1: structure tridimensionnelle d'un monomère de concanaviline A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (Lenka, 2006).

3.2 Les lectines en mosaïque :

Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al.*, 2006).

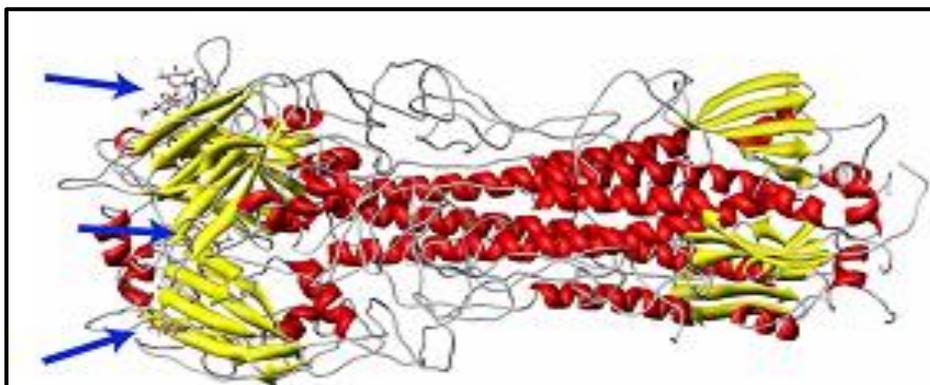


Figure 2 : structure tridimensionnelle d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (Lenka, 2006).

3.3 .Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbrial

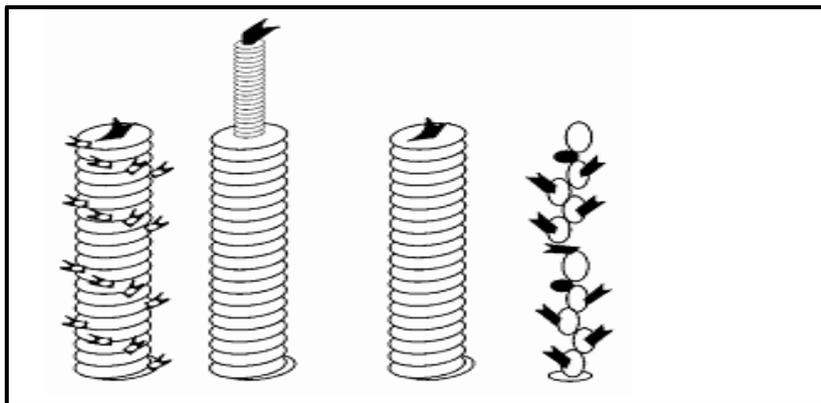


Figure 3 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli*. (Lis and Sharon, 1998)

4. Les sites de liaisons des lectines

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand. La lectine interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (**Goldstein et Poretz, 1986**). Les interactions de type salin ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectine-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (**Pontet, 1996**). Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels se lient (**Gabius, 1985**).

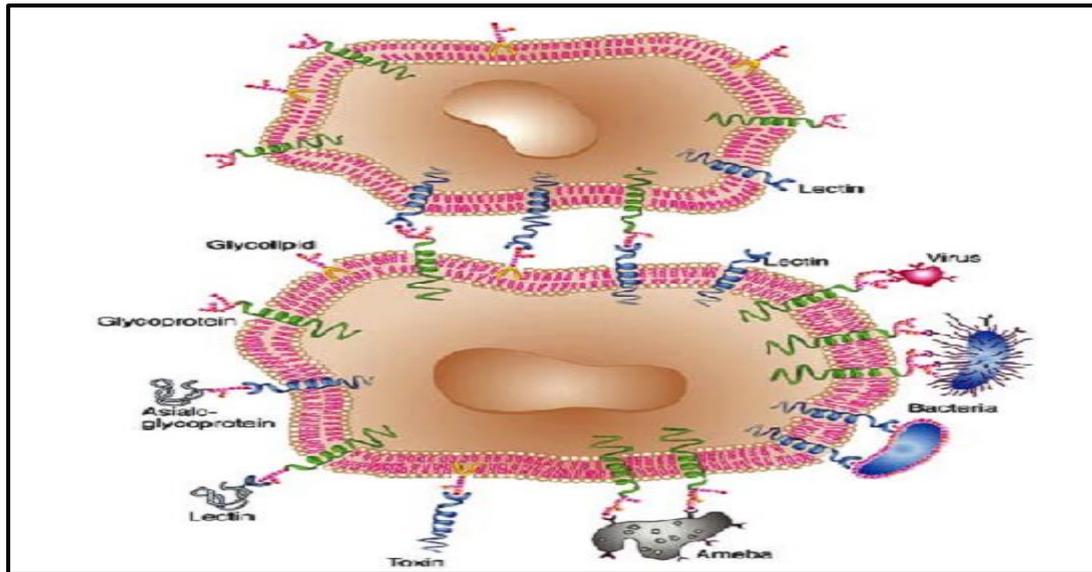


Figure 4 : Représentation schématique d'un exemple d'interaction lectines-glucides (Gianluca, 2006).

5. Les lectines dans le monde vivant

Bien que les lectines furent initialement découvertes chez les plantes, ce sont des protéines ubiquitaires. Elles sont universellement distribuées aussi bien chez les microorganismes (virus, bactéries, champignon) que chez les animaux, les procaryotes et les eucaryotes.

5.1 Les lectines des microorganismes

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasite eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les glycanes présents sur la surface des cellules hôte.

5.1.1 Les lectines virales

Divers virus possèdent à leur surface des lectines leur permettant d'interagir avec les cellules animales.

5.1.2 Les lectines des champignons

Les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc.

5.1.3 Les lectines bactériennes

De nombreuses bactéries possèdent des lectines nommées adhésines. Ces lectines permettent l'adhésion de la bactérie pathogène à la cellule hôte et assurent l'initiation de l'infection. Les adhésines sont situées sur des appendices submicroscopiques appelées fimbriae (ou pili). Ces structures sont composées de nombreuses sous-unités diverses. La sous-unité lectinique est à la fois localisée au sommet et le long du pilus

5.2 Les lectines animales

Les mammifères produisent une grande variété de lectines impliquées dans la reconnaissance cellulaire : les lectines toxines, les I-lectines, les P-lectines, les S-lectines et les C-lectines.

Les S-lectines et les C-lectines sont les plus largement distribuées et bien qu'elles coexistent chez les organismes supérieurs, l'analyse des séquences protéiques n'a révélé aucune parenté évolutive entre ces deux groupes de lectines (**Drickamer, 1988**)

5.3 Les lectines végétales

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (ex., les lectines de légumineuse, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquence et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées, Ces protéines peuvent être présentes dans les graines, feuilles, tiges et racines des végétaux (**SHARON & LIS, 1990, LORIS *et al.* 1998**).

Une autre grande famille de lectines d'origine végétale qui a pu être caractérisée est la famille des Gramineae (céréales) à laquelle appartient la lectine de germe de grain de blé (WGA). Les lectines de céréales présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi appelés domaine hévéine. La première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA (**Wright, C. S. 1980**).

6. Classification des lectines végétales

6.1 Selon la Spécificité osidique

Une classification des lectines végétales basée sur leur spécificité de reconnaissance avait été proposée initialement par Goldstein et Poretz (1986). Les lectines sont classées en 6 groupes de spécificités différentes : Man/Glc-spécifiques, N-acétylglucosamine-spécifiques, Gal-spécifiques, N-acétylgalactosamine-spécifiques, L-Fuc-spécifiques et acide sialique-spécifiques (Wu, 1988), cette classification permet de définir les propriétés des lectines, mais elle ne fournit aucun renseignement sur leur structure moléculaire.

Tableau 3 : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines (Renato, et coll. 1991).

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adeniadigitata</i>	Gal
<i>Aleuria aurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man >Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordica charantia</i>	GalNAc
<i>Cytissus sessilifolia</i>	GlcNac>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc

6.2 Selon la structure quaternaire

Peumans et Van Damme (1995) ont récemment proposé une classification des lectines végétales en quatre groupes (mérolectines, hololectines, chimerolectines et superlectines) selon leur structure quaternaire mais aussi leur réactivité (nombre de sites fonctionnels).

6.2.1 Les mérolectines

Sont des protéines de faible masse moléculaire, constituées d'un seul monomère. Elles possèdent un site unique de reconnaissance des glycanes et donc elles ne peuvent agglutiner ni les érythrocytes, ni les cellules

6.2.2 Les hololectines

Sont des protéines possédant au moins deux sites de reconnaissance des glycanes. Ces deux sites de reconnaissance sont identiques ou très homologues et lient des glycanes de structure similaire. Les hololectines sont donc des protéines di- ou multivalentes. Elles ont, en conséquence, la faculté d'agglutiner les érythrocytes, les cellules et de précipiter les glycoconjugués, La majorité des lectines de plantes appartiennent à ce groupe

6.2.3 Les chimérolectines

Sont des protéines de fusion. Elles sont constituées d'une chaîne peptidique fixant les glycanes associée en tandem avec une chaîne peptidique qui peut avoir une activité (catalytique ou autre) bien définie. Par exemple, la ricine du Ricin (*Ricinus communis*) est une chimérolectine appartenant à la famille des RIP de type 2

6.2.4 Les superlectines

Peuvent être des hololectines possédant plus de deux sites de reconnaissance des glycanes ; chaque site de reconnaissance pouvant reconnaître des structures glycaniques différentes Elles peuvent être aussi considérées comme des chimérolectines composées cette fois de deux domaines fixant les glycanes, Ces deux domaines sont structuralement et fonctionnellement différents l'un de l'autre

7. Rôle des lectines dans les organismes vivants

Le tableau suivant récapitule le rôle des différentes lectines chez les bactéries, les virus, les toxines, les plantes.

Tableau 4: Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant (**Guillot, J., Kanska G., 1997**)

Lectines	Rôles
<i>Bactéries</i>	
Lectines fimbriales	Adhésion, infection
Lectines solubles Toxines	Adhésion, infection, formation de biofilm
Toxines	Adhésion, infection
<i>Virus</i>	
Influenza hémagglutinine	Adhésion, infection
<i>Amoeba</i>	
Lectines de surface	Adhésion
<i>Plantes</i>	
Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
Autres	Défense
Galectines	Reconnaissance des glycannes dans la matrice extracellulaire

8. Propriétés Biologiques des lectines

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées.

8.1. Liaison avec les sucres

Les lectines sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués que d'autres (**Jain *et al.*, 2001**). ces glycannes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectine (**Jeyaprakashet *al.*, 2003**). La partie non glycanique des glycoconjugués peut également interagir avec les acides aminés avoisinant la cavité de reconnaissance (**Jeyaprakashet *al.*, 2003**).

8.2 L'agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans et coll., 1995 ; Wang et coll., 1998**).

8.3 Effets mimétiques des hormones

Les lectines des graines d'haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines de haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (**Greer et coll., 1985**).

8.4 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

Les travaux de Valentier et coll. (2003) suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme in vitro. Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (**Poiroux, 2011**). Egalement ils inhibent leur migration (**Banwell, 1983**).

8.5 Activité mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Babosa, 2001**).

8.6 La propriété antibactérienne

Les lectines sont des outils de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (**Tanne et Neyrolles, 2010**). Les lectines animales comme les lectines récepteurs des kinases (LecRKs) sont impliquées dans la résistance aux bactéries (**Singh et al., 2012**) aussi bien pour les lectines de type C qui résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al., 2014**). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhang et al., 2012 ; Huang et al., 2014 ; Xu et al., 2014**).

8.7 Actions antivirales

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (**Wang et coll, 1998**). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH0. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolious* (**Lopez 2003**).

8.8 Autres propriétés

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (**Nachbar et coll. 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreuy 1997**), l'induction de l'apoptose (**Kulkarni 1998**).

9. Utilisation des lectines

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'évènements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis and Sharon 1998**). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

9.1 Dans le domaine biomédical

9.1.1 Hématologie

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Sharpleigh 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

9.1.2 Immunologie

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi 2004**). Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

9.1.3 Biologie cellulaire

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques (**Jaffe, 1980**).

9.1.4 Cancérologie

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot, coll. 2004**). Kenoth et al (2001) rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses

Les lectines sont suggères comme transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

Tableau 5 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical **Murdockl .L Shade R.E (2002)**

Propriétés	Applications
Agglutination spécifique des GR selon le groupe sanguin	-Typage du sang - identification de nouveaux groupes Sanguins
Induction de la mitose	-étude de la constitution chromosomique de la cellule et détection des anomalies
Agglutination cellulaire	-recherche sur l'architecture des membranes externes cellulaires, leurs changements et transformations. - phagocytose et motilité. Diminution de la croissance des cellules Tumorales
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	-isolement, purification et études structurales des glucides, - purification des glycoconjugués (enzymes, hormones) - modèles pour la réaction antigène anticorps (test ELISA, etc)
Liaison aux sucres	- études des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. - structure et fonctionnement des Membranes

9.2 Dans le domaine agronomique

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures (**Murdock et coll. , 2002**).

9.3 En biochimie et protéomique

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique) ;pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou un une enzyme , immuno-blotting , immuno-précipitation ...).Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique , peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . (**DOLE.A. et Lindeberg. S. ,2005**).

Chapitre 2

Les médicaments

Anti- inflammatoires

1. L' Inflammation

1.1 Définition de l'inflammation

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé. Une régulation défectueuse peut engendrer des dommages irréversibles. Une réponse insuffisante conduit à une immunodéficience pouvant entraîner une infection secondaire ou même un cancer. Exacerbée, au contraire, elle augmente la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le diabète. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme *via* la circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès **(Nathan, 2002; Barton, 2008)**.

De nombreuses substances telles que LPS peuvent provoquer les réactions inflammatoires dans l'organisme.

1.2 Définition de LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est une endotoxine de nature glycolipidique représente la principale composante non protéique de la membrane externe des bactéries Gram négatif, il a les propriétés amphipathiques de phospholipides et remplit plusieurs fonctions. La plus haute importance est son rôle dans les zones semi-perméable, permettant seulement le passage de bas poids moléculaire et les molécules hydrophiles **(Trent *et al.*, 2010)**.

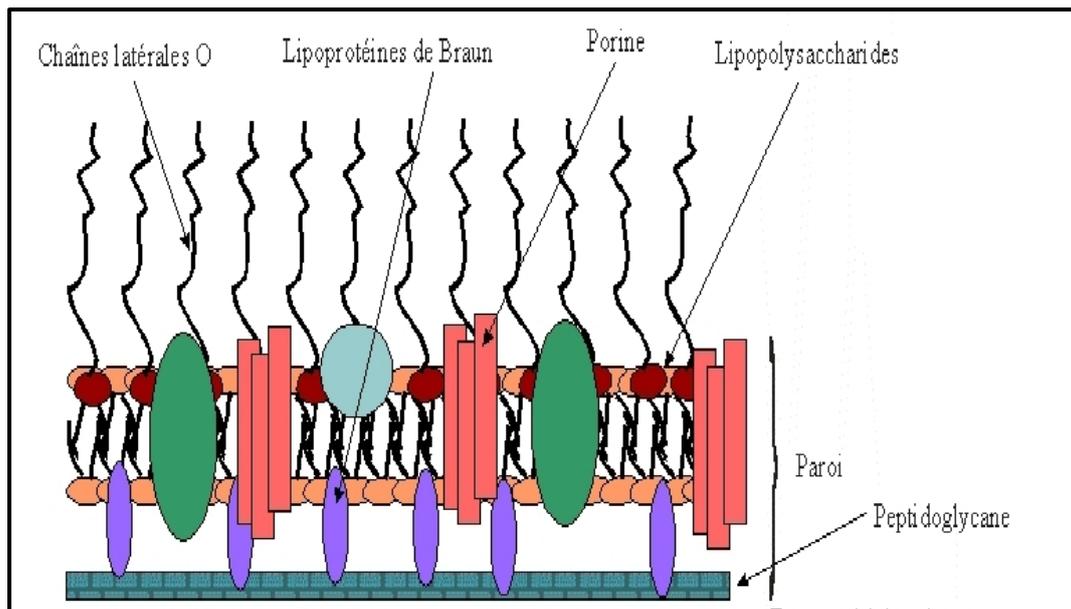


Figure 5: la paroi des bactéries Gram négative (Nikaido et Vaara, 1987).

1.3 La Structure du LPS

Les LPS sont des complexes macromoléculaires organisés en trois domaines :

- **Le lipide A** : situé à la partie proximale du LPS et à l'intérieur de la bicouche lipidique, possède un caractère hydrophobe. (Nikaido et Vaara, 1987).

- **l'antigène O** : situé à la partie distale du LPS, de nature polysaccharidique, possède un caractère hydrophile. (SZALO I.M. et al.2006)

- **le noyau** (ou « core ») de nature polysaccharidique : représente le pont entre les deux autres parties et est divisé à son tour en deux parties : le noyau interne plutôt hydrophobe et le noyau externe plutôt hydrophile (Nikaido et Vaara, 1987).

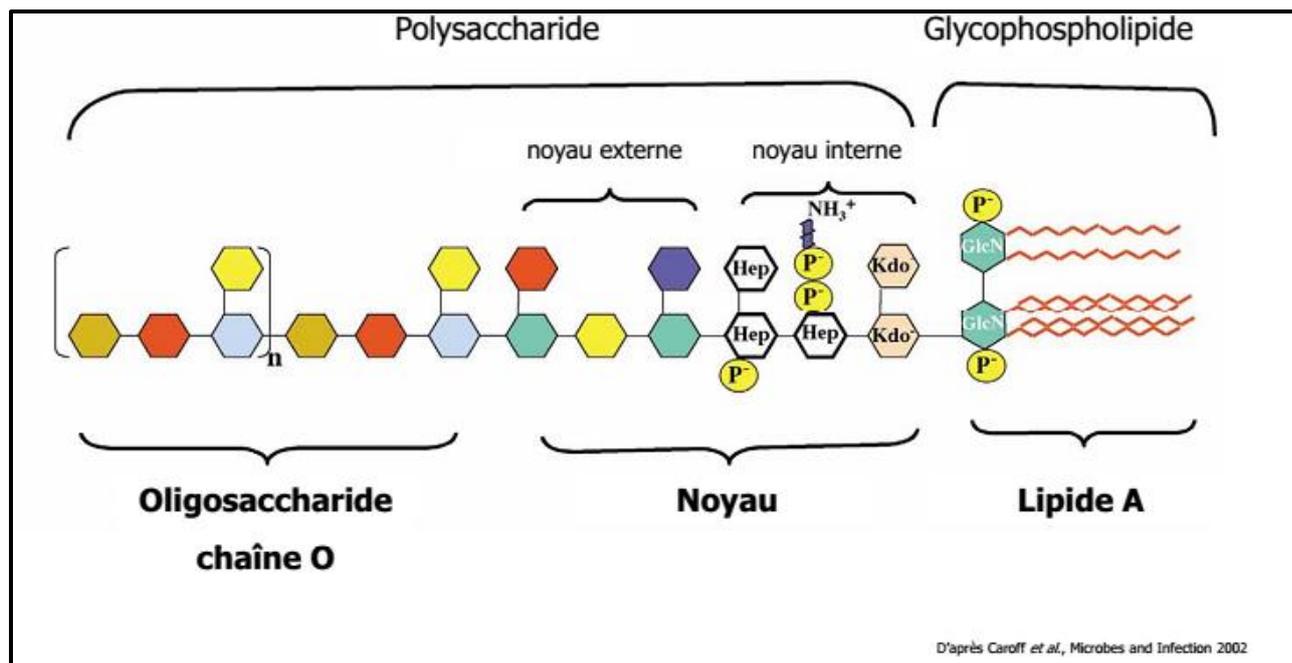


Figure 6: structure schématique de la molécule de lipopolysaccharide

(Nikaido et Vaara, 1987).

1.4. La Physiopathologie du LPS

Le LPS se lie au récepteur TLR4 et promeut la libération de cytokines pro-inflammatoires. Il induit chez l'homme des signes cliniques (hyperthermie, agrégation des hématies, choc septique – diminution de la pression artérielle). C'est la partie *lipide A* qui est considérée comme la plus toxique (action sur les granulocytes et les cellules épithéliales). Dans la recherche fondamentale, le LPS est beaucoup utilisé pour induire l'inflammation tel que l'induction de la cyclooxygénase 2 sur des cellules ou des organes en culture, généralement il est utilisé à une concentration de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. (Trent *et al.*, 2010).

2. Les anti-inflammatoires

2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon

un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule. Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes. Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 **(Barnes, 1998)**.

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la trans activation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire .

2.2. Anti-inflammatoire non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (figure 10). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines

(Nicolas *et al.*, 2001). Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS Semblait donc jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables Et délétères (Blain *et al.*, 2000).

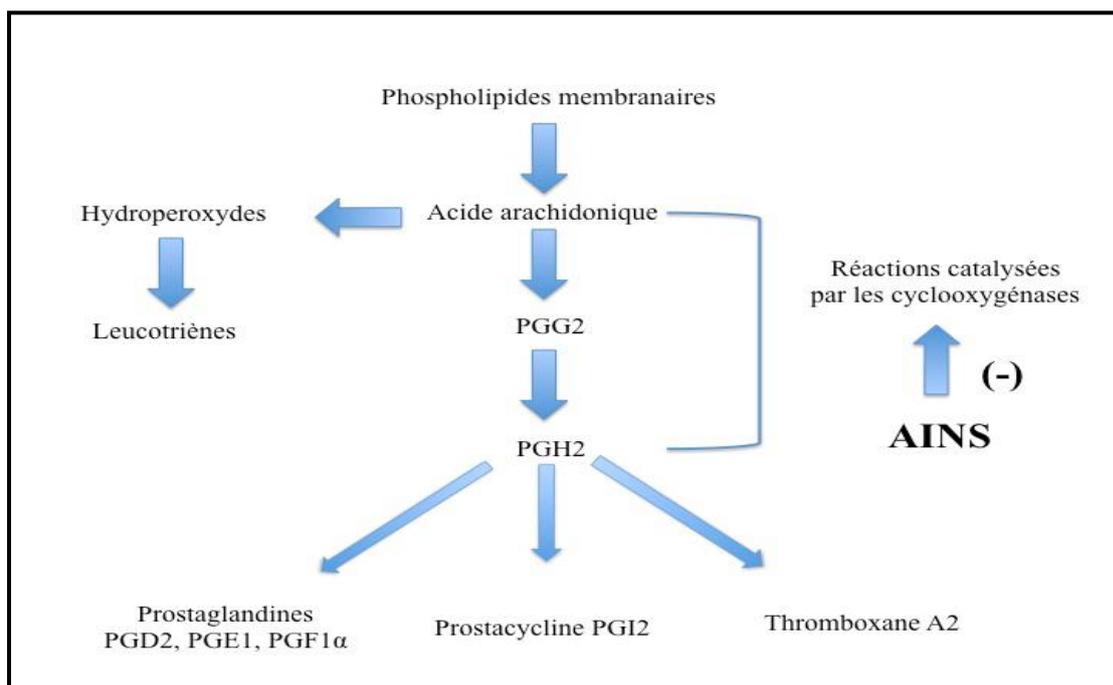


Figure 7 : Mécanisme d'action des AINS (Nicolas *et al.*, 2001).

on va prendre le diclofenac comme un model des anti-inflammatoire non stéroïdiens

2.2.1 Le diclofenac

2.2.1.1 Les propriétés du diclofenac

est un dérivé arylacétique, produit qui entre dans la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens (wikipédia, 2016).

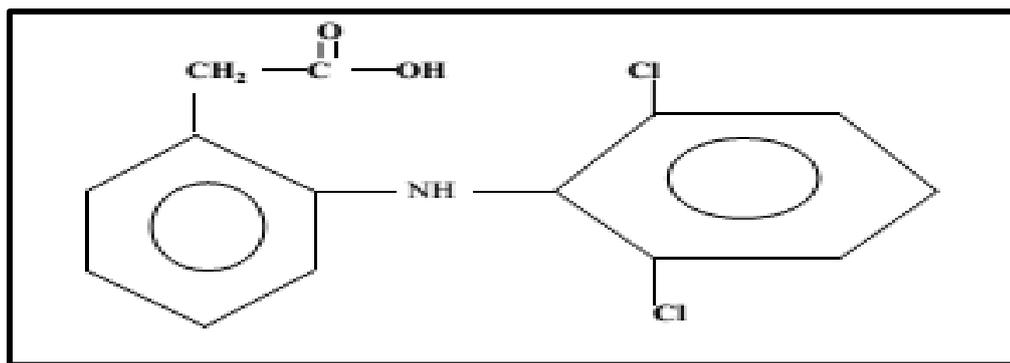


Figure 8 : Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac
(Schorderet, 1989).

2.2.1.2 La Pharmacocinétique du diclofénac

Les principales propriétés pharmacologiques du diclofénac (Nicolas *et al.*, 2001).sont :

• Absorption

Le diclofénac comprimé est rapidement et totalement absorbé, les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes environ 2 heures après administration et se situent autour de 1.5 mg/l pour un comprimé à 50 mg et 0.8 mg/l pour un comprimé à 25 mg. L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps est approximativement le double de celle obtenue après une dose équivalente administrée par voie intraveineuse, ceci étant dû à un effet de premier passage, pour les suppositoires à 100 mg le pic de concentration est atteint au bout de 30 min

• Distribution

La liaison aux protéines plasmatiques est de 99.7% de diclofénac et les concentrations de substance active sont élevées dans le liquide synovial que le plasma et restent pendant une période de 12 heures. Le diclofénac n'est pas détectable dans le lait maternel.

• Métabolisme et excrétion

Le métabolisme du diclofénac comprend une conjugaison directe du médicament inchargé, ou une oxydation sur la position 3' ou 4' du noyau dichloro-phényl, ou alternativement en position 5 du noyau phényl rattaché au radical acétique. Un métabolite principal chez l'homme est le composé 4'-hydroxydiclofénac. La quantité excrétée dans l'urine est d'environ 20 à 30 % de la dose. Trois autres métabolites constituent chacun 10 à 20 % de la dose excrétée dans l'urine et de faibles quantités de la dose excrétée dans la bile. Les conjugués du diclofenac se retrouvent dans la proportion de

5 à 10 % de la dose dans l'urine et moins de 5 % dans la bile.

Environ 90 % d'une dose orale ou intraveineuse sont excrétés dans les premières 96 heures après l'administration. 0.7 % de la dose sont excrétés dans l'urine sous forme de diclofénac inchargé et 5 à 10 % sous forme de diclofénac conjugué, 60 % de la dose sont excrétés sous forme de composés hydroxylés conjugués.

La demi-vie d'élimination du médicament inchargé après administration orale se situe autour de 1 h 50 et sa clairance plasmatique est de 263 ml/min.

2.2.1.3. La Pharmacodynamie du diclofénac

Les effets du diclofénac reposent en grande partie sur l'inhibition des cyclooxygénases de types 1 et 2 (COX-1 et COX-2). Ces enzymes présentes partout dans l'organisme participent à la production des prostaglandines, qui sont d'importants médiateurs de la douleur, de la fièvre et des réactions d'adaptation et de protection de nombreux organes et tissus. (Nicolas *et al.*, 2001).

2.3. Les Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (Barnes, 1998).

Le choix d'un Anti-inflammatoires d'origine végétale : La plante Alenda (*Ephedra alata*)

2.3.1 La Description botanique d'*Ephedra alata*

La famille des *Ephedraceae* représentée par le seul genre Ephédra inclue environ 40 espèces dans le monde. L'espèce *Ephedra alata* est une plante médicinale appartenant au genre Ephedra originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte et l'Arabie (Ozenda, 1991). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991). est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, à rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des

nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre. Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (Derbel et al., 2010).



Figure 9 : *Ephedra alata alenda* (N'Goussa "Novembre 2014") (originale).

2.3.2 La Classification scientifique d'*Ephedra alata*

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Classe	Gnetopsida
Ordre	Ephedrales
Famille	Ephedraceae
Genre	Ephedra
Espèce	<i>Ephedra alata</i>
Sous espèce	<i>Ephedra alata alenda</i>

2.3.3. Les Propriétés médicinales d'*Ephedra alata*

- ✚ En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (**Nawwar et al., 1984**).
- ✚ En Arabie Saoudite, *Ephedra* est l'une des plantes de parcours les plus répandues. Elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (**AL-Qarawi et al., 2012**).
- ✚ Au Maroc, l'*Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (**Ghourri et al., 2013**).
- ✚ En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (**Ould El Hadj et al., 2003**).
- ✚ Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud (**Abourashed et al., 2003**).

Chapitre 3

Le stress oxydant

1-Définition

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (**Durackova, 2008**).

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (figure10). Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers » (**Baskin et al., 1994 ; Barouki, 2006 ; Jenkins et al., 2007**). Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus (**Kehrer , 1993 ; Barouki , 2006**). D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération des ROS (reactive oxygen species) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage (**Kehrer, 1993**).

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels (**Durackova, 2008**) et à des dégâts cellulaires irréversibles (**Pincemail et al., 1999 ; Abuja et al., 2001**)».

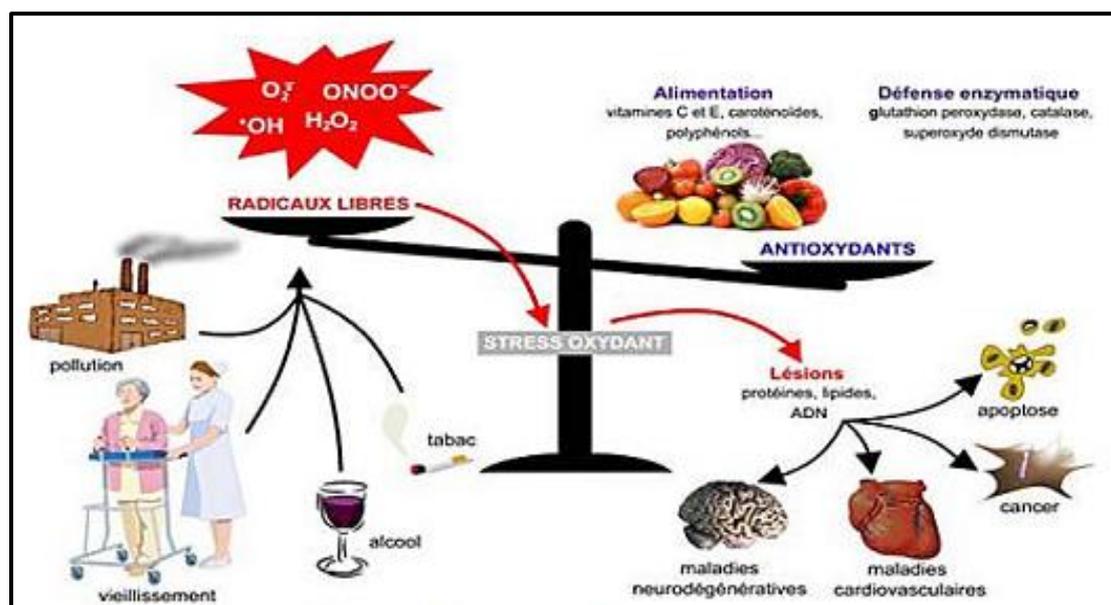


Figure 10 : Stress oxydant (**Durackova, 2008**)

2. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il a été caractérisé en 1772-1774 par Lavoisier, un chimiste français. L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d'O₂. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{•-}) ou le radical hydroxyle (HO[•]) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂) (**Simonian and Coyle, 1996 ; Garrel et al., 2007**). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H₂O₂ qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue.

La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{•-}) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O₂^{•-}) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO[•]) ou surtout le radical hydroxyle (HO[•]), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du cuivre cuivreux ou du fer ferreux, le H₂O₂ peut se décomposer en HO[•] et HO[•] selon la réaction de Fenton. Le radical HO[•] a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (figure 11) (**Favier, 1997**).

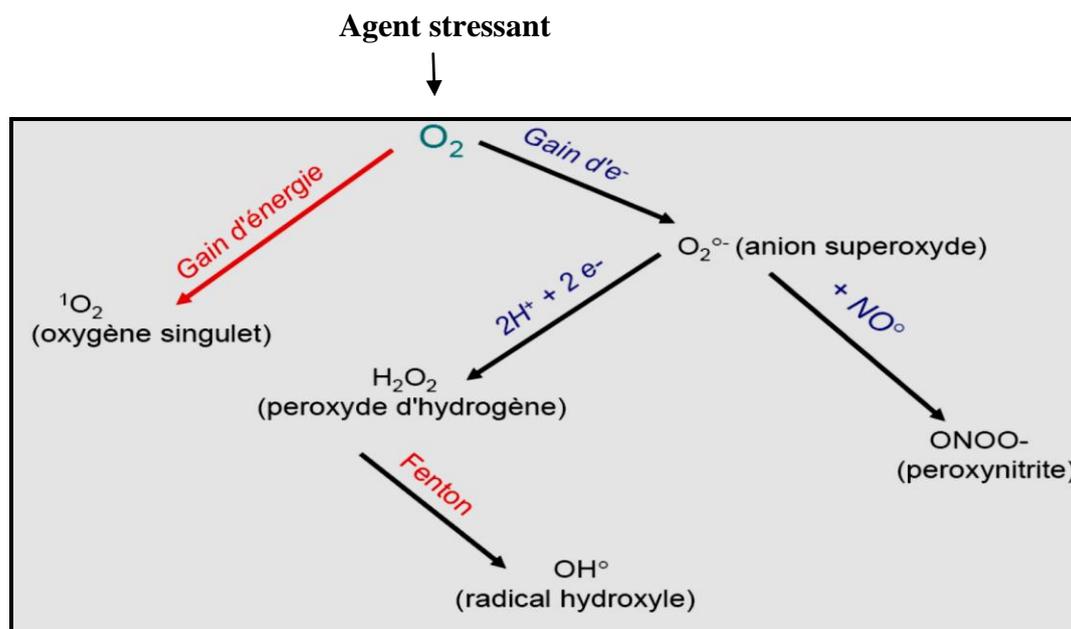


Figure 11 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

L'oxygène singulet (1O_2) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Favier, 2003).

3. Les cibles biologiques du stress oxydant

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (Pincemail *et al.*, 1999). La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme (Sies, 1991). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Gutteridge, 1992 ; Curtin *et al.*, 2002).

3.1. Les lipides

Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$), entraînant l'arrachement d'un hydrogène du l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde (LOO°). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase « Propagation » de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés « phase de Terminaison » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (**Esterbauer *et al.*, 1992 ; Beaudeau *et al.*, 2003 ; Favier, 2003**) (figure12). Ou, continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (**Marnett, 1999**).

1999). Les bases puriques sont plus sensibles aux ROS (surtout l' $^{\circ}\text{OH}$ et le peroxy-nitrite), en particulier la guanine (base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas), qui est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défaillants, La 8- OH dG s'accumulera au sein de l'ADN (Cadet, 1999). Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999 ; Nair *et al.*, 1999).

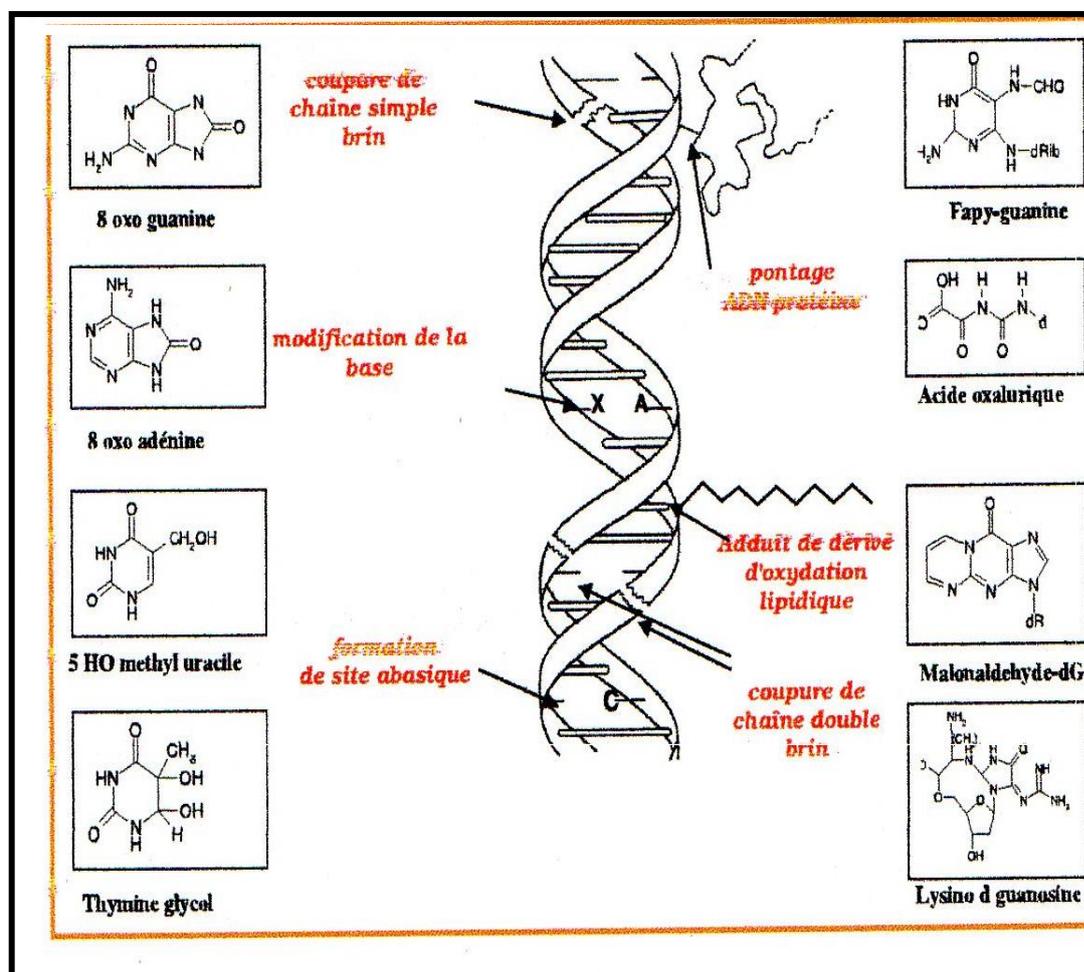


Figure 14 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)

4. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (figure 15). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (**Favier, 2003**).

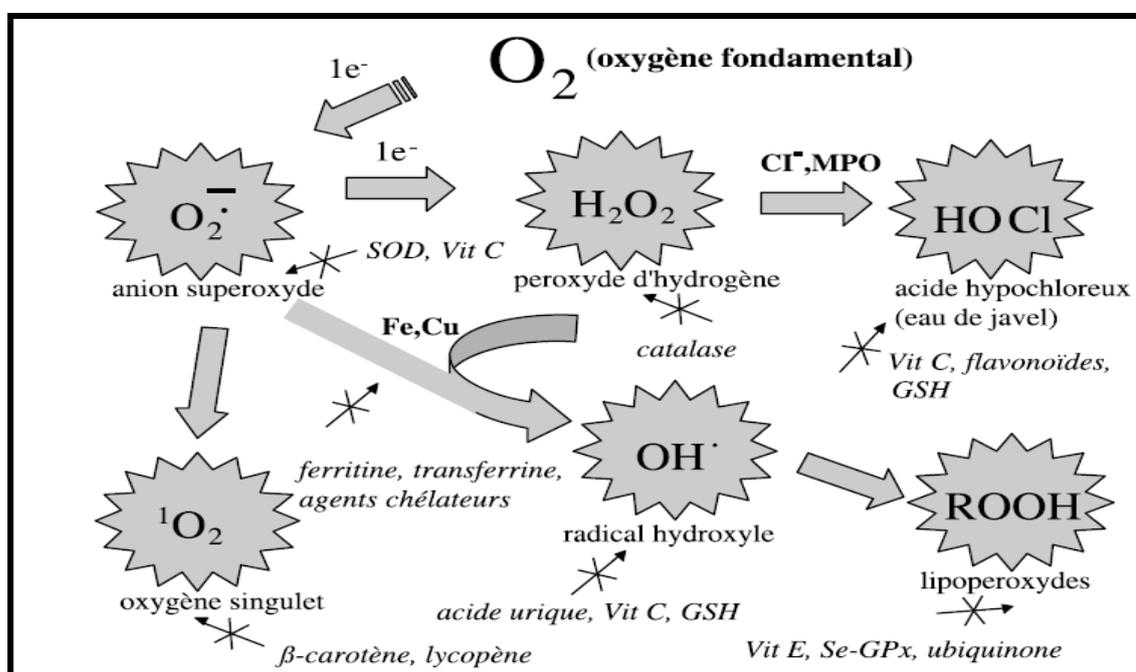


Figure15 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (**Milbury et Richer et al., 2008**).

4.1. Les systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) le superoxyde dismutase (SOD), (II) la catalase (CAT) et (III) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet -}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

a) La Superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, le superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (**Zelko *et al.*, 2002**).

b) La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Sorg, 2004**).

c) Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

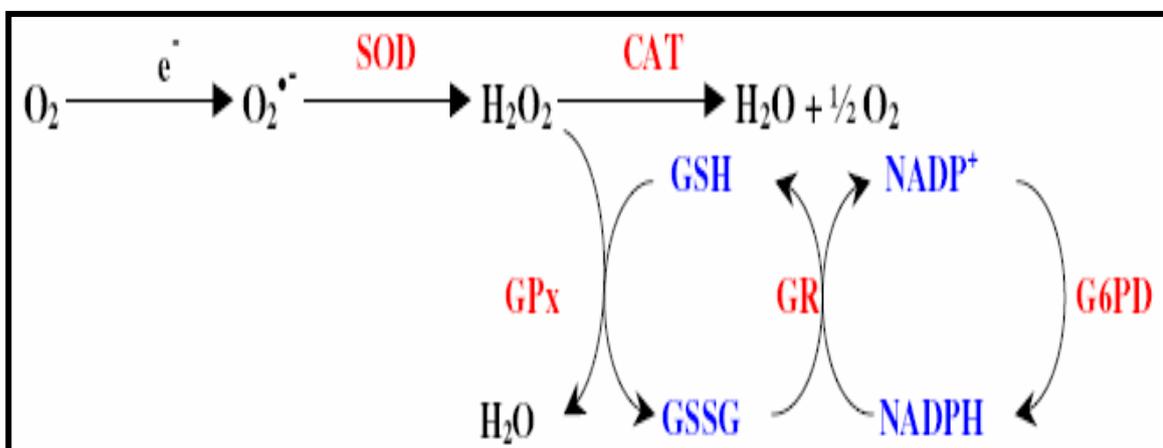


Figure 16 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (**Piquet et herbuterne, 2007**).

4.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le Cytochrome C et les vitamines E et C (**Favier, 2003**).

4.2.1. Le Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Packer *et al.*, 1997 ; Power and Lennon, 1999**). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé Et le glutathion oxydé augmenté (**Ji *et al.*, 1992**).

4.2.2. La Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂ (**Singh *et al.*, 2005**).

4.2.3. La Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Singh *et al.*, 2005**)

Section II

Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes des tests biologiques

L'objectif de cette partie a été focalisé sur l'étude de l'effet hépato-protecteur de lectine partiellement purifiée à partir de la plante *Ephedra alata* sur l'inflammation induite par LPS afin de voir s'il ya un bénéfice d'utiliser cette antioxydant. et la valorisation de cette plante.

1.1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 30 rats blancs *Rattus* de la souche *Wistar*, provenant de l'institut pasteur d'Alger. Agés de 5-6 semaines, d'un poids vif moyen de 90 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle. Les rats sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti *et al.*,1989).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
<i>Mais</i>	420	42
<i>Soja</i>	260	26
<i>saccharose</i>	210	21
<i>Huile</i>	20	2
<i>Son</i>	60	6
<i>VMV</i>	30	3

1.2. Le Traitement des rats

L'étude est réalisée sur 30 rats réparties en 6 lots pendant une période de 7 jours

- ✓ Le premier groupe est le lot contrôle qui ne reçoit aucun traitement (Lot témoin), la deuxième lot est traité par lectine, la troisième par diclofenac, le quatrième groupe par LPS, le cinquième groupe par lectine +LPS et le dernier lot par diclofenac+LPS
- ✓ Le poids corporel des rats est mesuré quotidiennement.
- ✓ Après 7 jours de traitement le sang et le foie sont prélevés (**figure17**).



Photo 2: injection intra péritonéale des rats.

1.3. Sacrifices et prélèvement du foie :

1.3.1. Prélèvement sanguin

Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes polyéthylènes étiquetés contenant l'anticoagulant EDTA. Ces tubes vont subir une centrifugation 3000 tours/min pendant 10 min, puis on récupère le plasma résultant. Les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur, à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques.



Photo 3: prélèvement de sang au niveau du sinus caverneux.

1.3.2 Prélèvement du foie

- ✓ Les animaux sacrifiés ont été pesés puis on a réalisé le prélèvement du foie
- ✓ Le foie, pesé puis stocké au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant.
- ✓ Une partie du foie est fixée dans le Bouin alcoolique afin de réaliser des coupes histologiques.



Photo 4: dissection et prélèvement de foie.

La figure 17 illustre les différentes étapes du protocole expérimental utilisé :

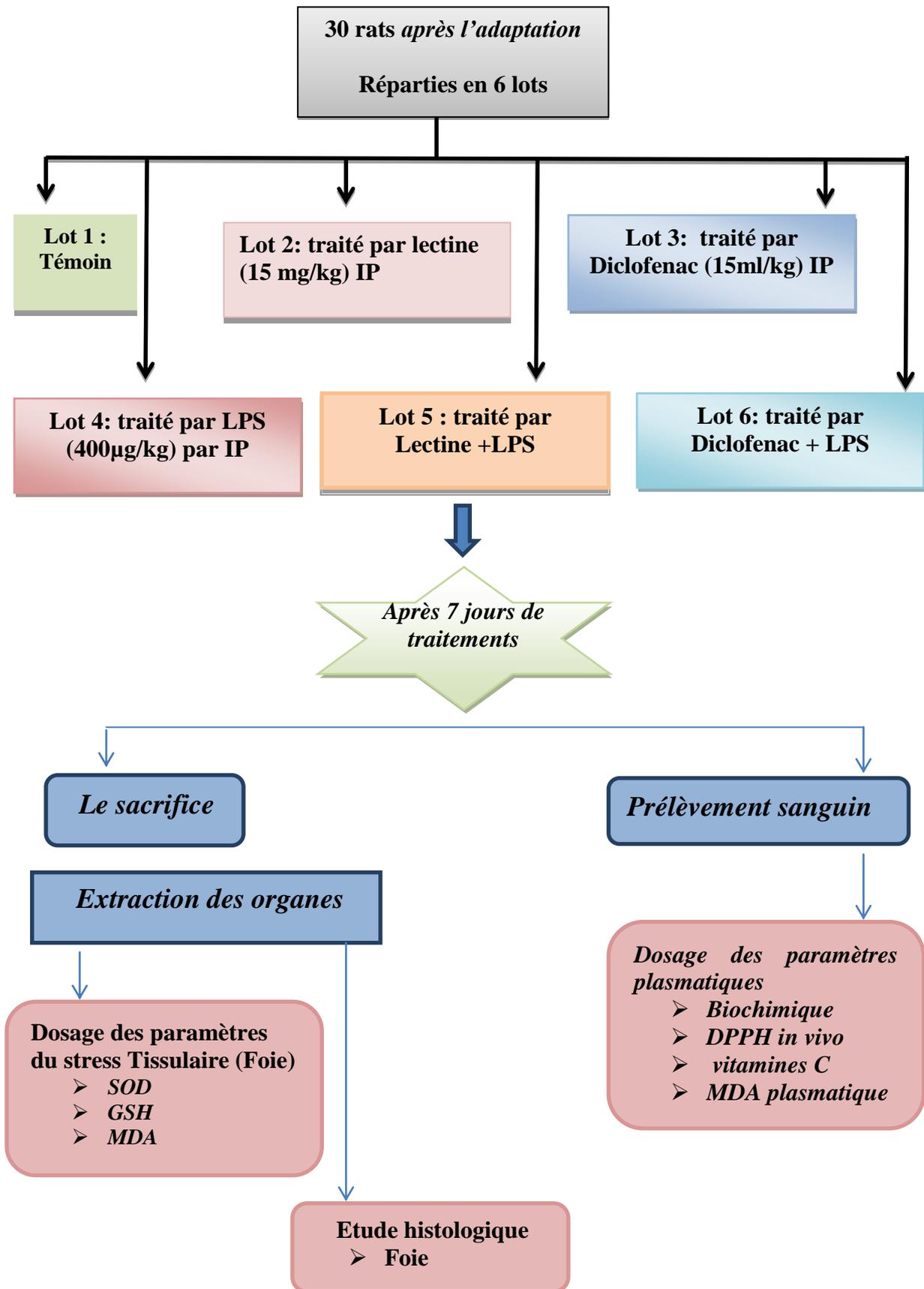


Figure 17 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

1.4. Les Méthodes de dosage

1.4.1. Dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques ont été accompli au sein d'un laboratoire d'analyse médicale à Annaba à l'aide d'un automate analyseur sanguin automatisé.

1.4.2. Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique

Le dosage des TBARs permet d'estimer le niveau de la peroxydation lipidique. Le principe de ce dosage repose sur la liaison en milieu acide (PH=2à3) et chaud du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rosé, le complexe MDA-(TBA)₂ qui absorbe à une longueur d'onde 532nm (**Richard *et al.*, 1992**) (**Annexe 01**).

1.4.3. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique

- **Dosage de la vitamine C**

La vitamine C plasmatique est dosée selon la méthode de **Jagota et Dani (1982)** utilisant le réactif de Folin et une gamme d'acide ascorbique (**Annexe 01**).

- **Dosage de radical DPPH in vivo**

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de **Hasani et ses collaborateurs (2007)** avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro* (**Annexe 01**).

1.4.4. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire

➤ Préparation de l'homogénat

0.5g de foie des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le tampon phosphate (0.1M, PH =7.8). On a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (5000 tours/min, 4°C, 15min). Puis le surnageant obtenu est aliquote dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

- **Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique**

Le dosage des TBARs permet d'estimer le niveau de la peroxydation lipidique. Le principe de ce dosage repose sur la liaison en milieu acide (PH=2à3) et chaud du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rosé, le complexe MDA-(TBA)₂ qui absorbe à une longueur d'onde 532nm (**Richard *et al.*, 1992**) (**Annexe 01**).

- **Dosage du glutathion**

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Wekbeker & Cory (1988)** (**Annexe 01**).

- **Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)**

Le dosage du superoxyde dismutase (SOD) est réalisé selon la méthode d'**Asada *et al* (1974)** (**Annexe 01**).

- **Dosage des protéines tissulaire**

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu de coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu (l'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines) (**Annexe 01**).

1.5. L'étude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau de laboratoire d'anatomie NIHA D'Annaba. La technique utilisée est celle décrite par **Houlot (1984) (Annexe 02)**.

1.6. Analyse statistique

Les résultats sont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type ($X \pm SEM$). La comparaison entre les différents groupes est effectuée par le test *t* de student.

a₁ : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$).

a₂ : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

a₃ : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$).

b₁ : Différence significative comparant au lot traité par LPS ($P \leq 0,05$).

b₂ : Différence hautement significative comparant au lot traité par le LPS ($P \leq 0,01$).

b₃ : Différence très hautement significative comparant au lot traité par LPS ($P \leq 0,001$).

P : seuil de signification.

Section III

*Résultats et
discussions*

1. Influence du traitement sur les variations du poids corporel et pondérales des organes

1.1. Résultats

Nos résultats montrent l'existence d'une diminution non significative du poids corporel, et une diminution du gain du poids chez les lots de traitement par rapport au témoin.

On note aussi une augmentation du poids corporels et une augmentation dans le gain du poids de façon non significative chez le lot traité par la combinaison D/LPS et L/LPS on comparant au lot traité par le LPS seul (**Tableau7**).

L'étude statistique de la variation de poids du foie par apport 100g du poids corporel a montré qu'il ya une différence non significative chez le lot traité par LPS. On note aussi une augmentation non significative chez les rats traités par la combinaison D/LPS et L/LPS. En revanche on registre, une diminution non significative de poids relatif du foie chez les rats traités par la combinaison D/LPS et L/LPS par rapport au lot traité par LPS seul (**Tableau7**)

Tableau 7: Variation de poids corporel (PC) et pondérales du foie (g) chez les rats témoins et traités après 7journes du traitement.

	T	L	D	LPS	L+LPS	D+LPS
Poids Initiale	87.3±10.3	88.7±12.1	88.5±14.2	87.7±10.1	89.01±13.5	88.1±11.5
Poids Final	89.19±11.5	90.01±13.5	89.3±14.1	84.2±10.3	86.7±10.1	87.3±10.2
Gain du poids	+1.89	+1.31	+0.6	-3.5	-2.31	-0.8
Poids du foie	3.16±0.23	3.4±0.4	3.36±0.2	4.36±1.3	3.9±0.14	3.6±0.1

1.2. Discussion

D'après nos résultats, le gain du poids corporel des rats a été affecté par LPS. En effet, nous avons remarqué une diminution de la croissance des rats traités au LPS comparativement aux témoins. Ceci est en accord avec les constatations de (**Necib et al., 2016**), Cette effet peut être expliquer par l'action de LPS sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminées, le glucose et les minéraux essentiels comme le sélénium, le zinc, le magnésium et le fer...) par

le sang et par conséquence, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le Corps.

Necib et al. (2016) ont signalé que l'augmentation des poids absolus ou relatifs des organes des animaux est un indicateur de la toxicité induite par les substances toxiques utilisées. Dans notre étude, LPS a augmenté les poids relatifs de foie ceci s'explique par l'accumulation du LPS dans ses organes cibles.

L'addition du diclofenac ou Lectine aux rats traités au LPS, a tendance à améliorer le gain du poids, portant ce n'est pas considérable. Une action protectrice semblable du diclofenac ou lectine a amélioré le poids corporel des animaux traités au LPS et dans une autre étude il a induit des blessures des reins (**Necib et al., 2016**).

La prévention de la perte du poids chez les rats traités par le mercure avec l'huile d'argan, peut être due à la régulation de l'homéostasie de glucose, à l'effet hypoglycémique, ou à la réduction des lipides (**Tastekin et al., 2006**), la capacité de renverser la néoglucogenèse et la prévention de la perte protéique peuvent être aussi à l'origine de la prévention de la perte du poids (**Rajagopal et Ssikala, 2008**), notre résultats et en accord avec les travaux de **Berrougui et al (2003)** qui ont trouvé une diminution dans le poids corporel des rats traités par l'huile d'argan pendant 7 semaines à une dose 10 ml/kg chez le rat.

2. Influence du traitement sur les variations de quelques Paramètres biochimiques

2.1. Résultats :

Les résultats illustrés (la figure.18) montrent une augmentation statistiquement très hautement significative dans la concentration plasmatique de CRP chez les lots traités par LPS, D/LPS et L/LPS par rapport au témoin. Par contre on note une diminution non significative chez les lots traités par L/LPS et D/LPS par rapport au lot traité par LPS seul.

2.2. Discussion :

Les résultats expérimentales montre qu'il y avait eu une augmentation dans le taux de CRP suite au traitement par lps cela est expliquer par la stimulation chronique des hépatocytes par les LPS d'*E. coli*.et conduit à la production de nombreuses protéines anti –inflammatoires appelées protéines de la phase aigue, parmi lesquelles on cite la CRP (**Gruys et al., 2005**).Ces résultats sont en accord avec ceux obtenues par **Iraz et al. (2015)**.

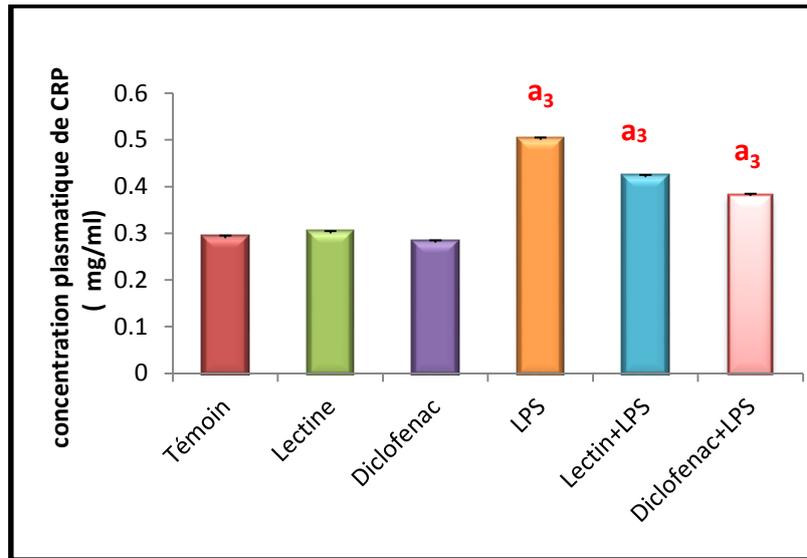


Figure.18 : Variation de la concentration plasmatique de CRP chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement.

a₃ : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$).

P : seuil de signification.

3. Influence du traitement sur les variations de l'activité sérique de quelques marqueurs enzymatiques

3.1. Résultats

Les résultats illustrés dans (figure.18) montrent une augmentation statistiquement non significative dans l'activité enzymatique de AST chez le lot traité par LPS et les trois lots de combinaison par rapport au témoin. Aussi on note une diminution non significative chez les lots traités par L/LPS et D/LPS par rapport au lot traité par LPS seul.

L'activité enzymatique d'ALAT et PAL a montré une élévation très hautement significative, hautement significative et significative chez les lots traités par LPS, L/LPS et D/LPS respectivement par rapport au lot témoin. On revanche, l'administration de lectine et

le diclofenac, pourrait réduire d'une façon non significative les niveaux de cette activité enzymatique par rapport au lot traité par LPS seul.

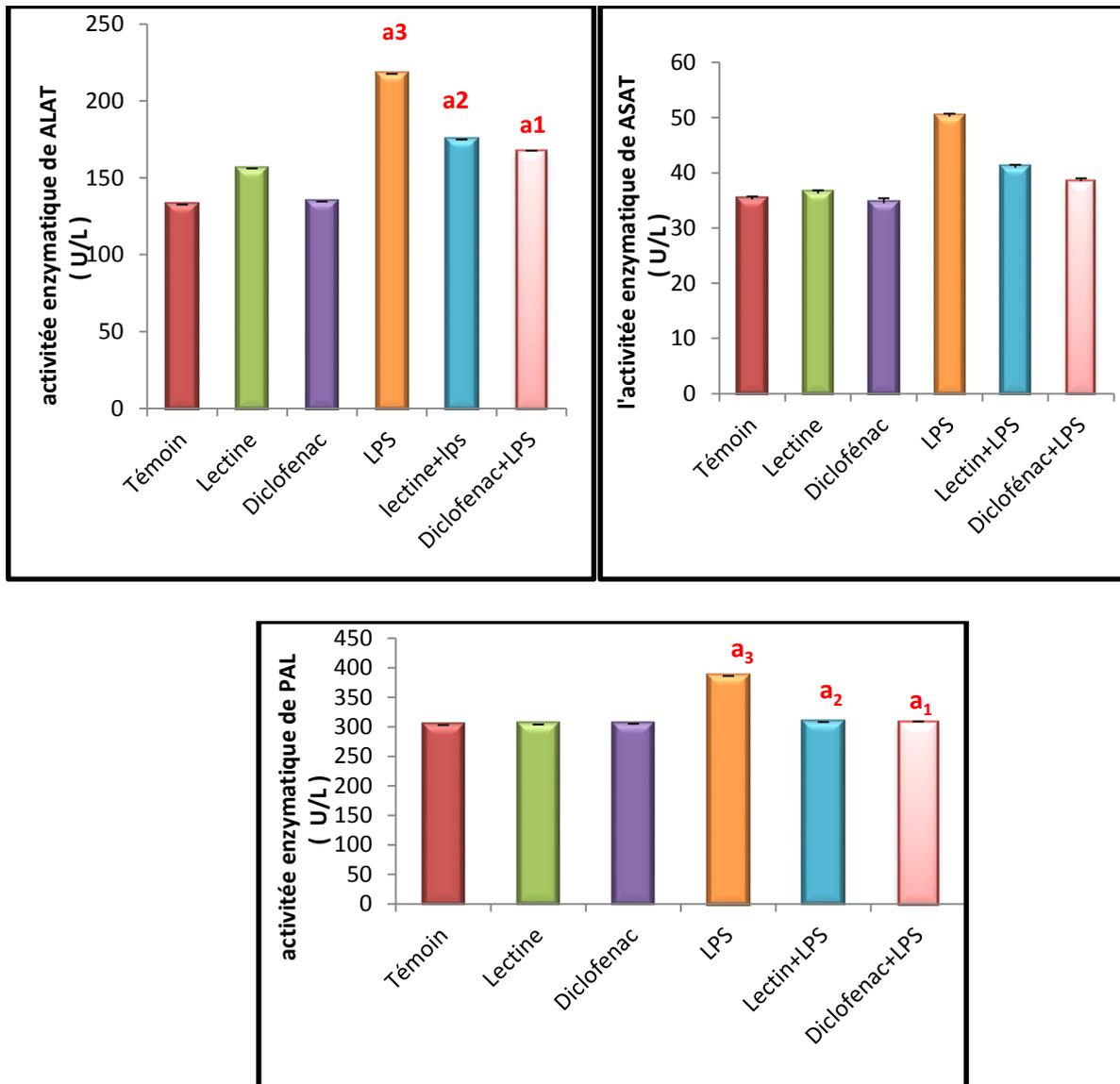


Figure.19 : Variation de l'activité enzymatique de ASAT, ALAT et PAL chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement.

a1 : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$).

a2 : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

a3 : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$).

P : seuil de signification.

3.2. Discussion :

Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité des transaminases (ASAT et ALAT) et PAL dans le sérum des rats traités au LPS. L'augmentation de ces enzymes indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma dû à l'altération de la perméabilité membranaire causé par LPS, ces résultats sont en accord avec les travaux de **Deepmala *et al* (2013)**. Et **Omar *et al.* (2013)**.

L'administration de diclofenac a atténué l'hépatotoxicité induit par le LPS, comme il est montré par les revenus des activités d'ASAT, ALAT et PAL à leurs niveaux normaux proches chez les rats témoins .l'effet précité indique clairement que le diclofenac peut offrir la protection en se stabilisant la membrane cellulaire des désordres hépatiques induites par le LPS. Les mêmes résultats on été obtenue par **Aouacheri *et al.*(2009)**,Qui ont révélé l'effet protecteur de diclofenac sur la toxicité induite par le paracétamol.

Le traitement par le lectine à améliorée l'activité des enzymes transaminases (ASAT, ALAT et PAL) chez les rats traités au LPS, ces résultats peuvent être expliquer par le fait que la lectine est un antioxydant qui a probablement stabilisé la membrane cellulaire hépatique et a protégé les hépatocytes contre les effets toxiques de LPS, ce qui peut diminuer la fuite des enzymes vers le plasma. Il a été noté que la lectine entraine une diminution significative des taux plasmatique des paramètres rénale et possède un effet préventif contre les dommages rénale provoqué par LPS . Ces résultats en accord avec les travaux de **Necib *et al.* (2016)**.

4. Influence du traitement sur la capacité anti-oxydante plasmatique

4.1. Résultats

Les résultats illustrés dans (fig.20) présentent une diminution très hautement significative, hautement significative et significative de DPPH chez les lots traités par LPS, L/LPS et D/LPS respectivement par rapport le témoin. En revanche, on constate une augmentation non significative chez tous les lots de traitement par rapport au lot traité par LPS seul.

L'analyse de la concentration plasmatique de vitamines C révèle l'existence une diminution très hautement significative chez les lots traités par LPS et hautement

significative chez les deux lots traités par la combinaison L/LPS et D/LPS par rapport le lot témoin et une augmentation hautement significative chez le lot traité par la combinaison L/LPS et D/LPS par rapport le lot traité par LPS seul.

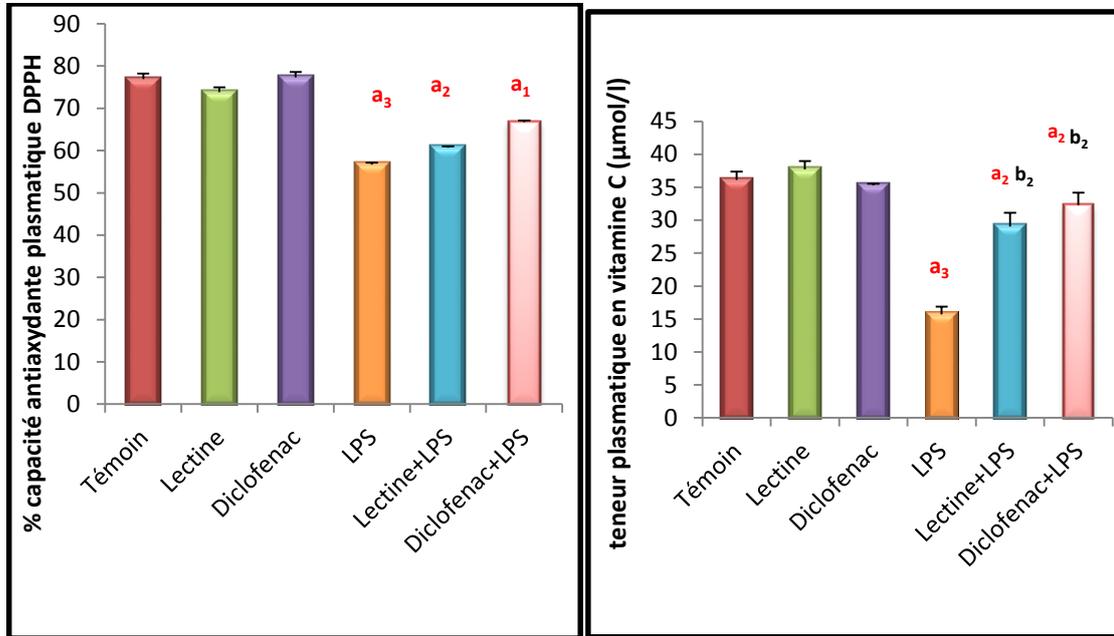


Figure .20 : Variation de la capacité anti-oxydante plasmatique vis-à-vis DPPH, la concentration plasmatique de vitamines C chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement.

a₁ : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$).

a₂ : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

a₃ : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$).

b₂ : Différence hautement significative comparant au lot traité par LPS ($P \leq 0,01$).

P : seuil de signification.

4.2. Discussion

Les résultats obtenus montrent que la capacité du plasma à absorber les radicaux libres, représentant le pouvoir antioxydant total (DPPH) est significativement abaissée chez les rats traités par LPS comparées aux rats témoins.

Le DPPH est un test qui consiste à évaluer la capacité que possède le plasma à inhiber la production d'espèces oxygénées réactives générées par un système *in vitro*. Le plasma renferme de nombreuses substances antioxydantes dont certaines sont connues (glutathion réduit, protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine.....), alors que d'autres ne sont pas clairement identifiées (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). Plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir antioxydant total du plasma due à l'ensemble de ces substances (**Prior et CAO, 1999**). La réduction de celui-ci est associée à une profusion des hydroperoxydes plasmatiques chez les rats traités par LPS, marquant l'existence d'un stress oxydatif évident..

Dans notre étude, la teneur plasmatique en vitamine antioxydante C est significativement abaissée chez les rats traités par LPS comparant aux témoins. Ceci peut s'expliquer par une défaillance du système de défense antioxydant ou une élévation de la production des radicaux libres chez les rats traités par LPS. Cette baisse de vitamine C peut être due à une excrétion urinaire élevée d'acide ascorbique (**yue et al., 1990**). Par ailleurs, le rôle de l'acide ascorbique est similaire à celui de GSH puisqu'il est aussi un piègeur des radicaux libres, et l'utilisation amplifiée de cette vitamine fait suite au stress oxydatif présent dans les rats traités par LPS. L'acide ascorbique est aussi utilisé dans la régénération de la vitamine E (**lee and dabrowski, 2003**).

Lorsqu'on examine le statut total antioxydant en déterminant l'activité de DPPH et le vitamine c dans le plasma on note à nouveau que les animaux traités par LPS démontre une baisse de ces indicateurs et le Diclofenac semble normaliser leurs concentrations.

En tenant les résultats obtenus, il paraît que l'augmentation de la capacité anti-oxydante plasmatique après l'administration de lectine, est probablement attribuée à une élévation du taux d'antioxydants exogènes tels que l'acide ascorbique.

5. Influence du traitement sur les variations des paramètres du stress oxydant

5.1. Résultats

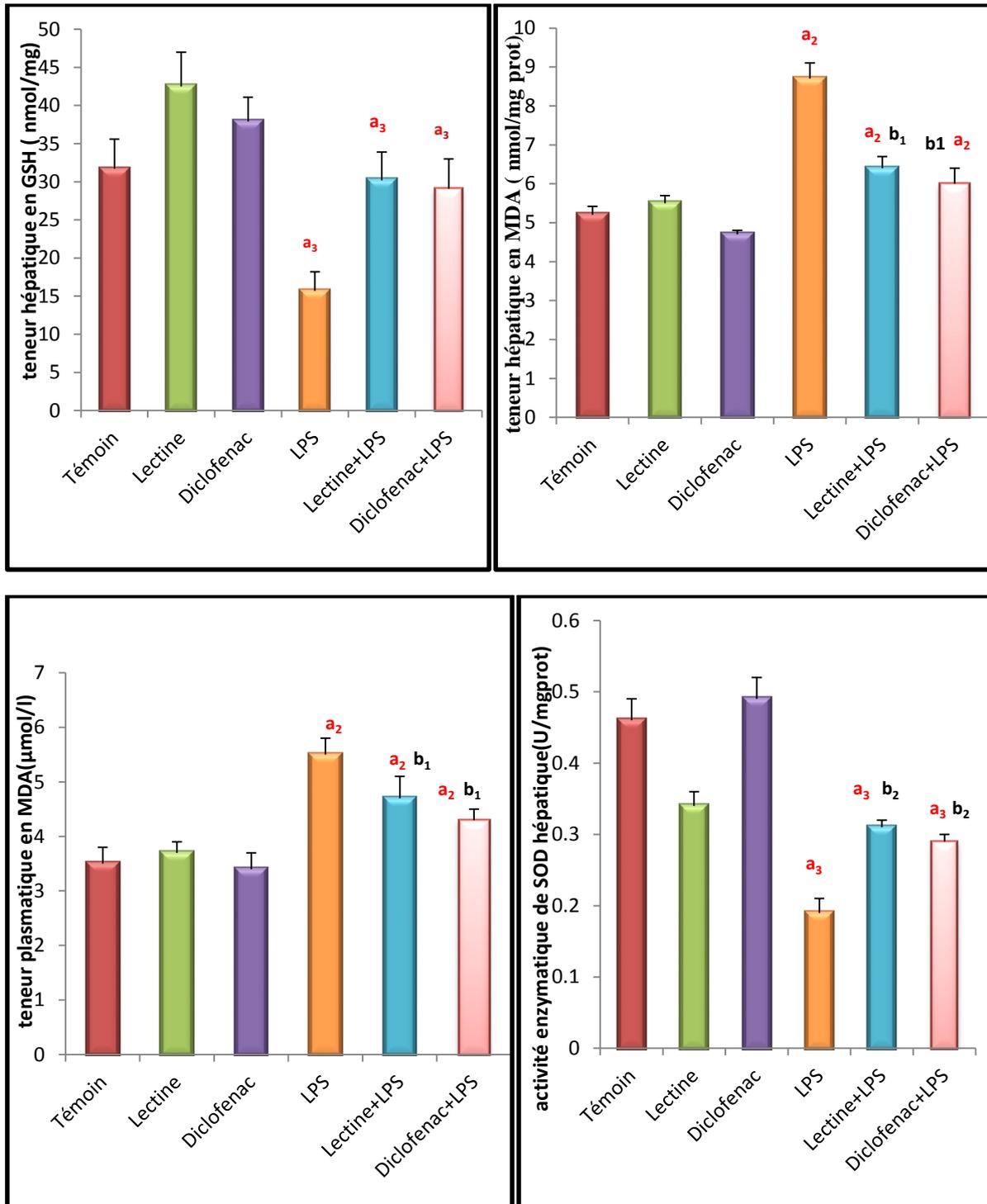


Figure.21 : variation de taux de GSH hépatique, MDA hépatique, plasmatique et l'activité enzymatique de SOD, hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 7 jours de traitement..

a₂ : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

a₃ : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$).

b₁ : Différence significative comparant au lot traité par LPS ($P \leq 0,05$).

b₂ : Différence hautement significative comparant au lot traité par LPS ($P \leq 0,01$).

Nos résultats (figure.21) révèlent que la concentration du GSH Hépatique diminue de façon très hautement significative chez les rats traités par LPS, D/LPS et L/LPS par rapport le témoin. En revanche, on constate une augmentation non significative chez tous les lots de traitement par rapport au lot traité par LPS seul.

D'autre part, nous enregistrons une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique et hépatique de MDA chez les lots traités par rapport le témoin. En revanche, on constate une diminution significative de cette concentration en comparant au lot traité par LPS seul. De plus, on note une diminution très hautement significative dans l'activité enzymatique de SOD hépatique par rapport le témoin. Par contre, on note une augmentation hautement significative dans cette activité comparant au lot traité par le LPS seul (figure. 21.).

5.2. Discussion

Nos résultats montrent une diminution de GSH hépatique et l'enzyme antioxydante (SOD) dans le foie et augmentation dans le taux de la peroxydation lipidique exprimé par MDA plasmatique et hépatique chez les rats traités par le LPS pendant 7 jours comparant aux témoins.

Face au dommage oxydatif causé par les radicaux libres oxygénés, et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification dont le plus important est celui du glutathion (**Kaplowitz et al., 1985**), D'après les résultats obtenus, le traitement des rats par LPS pendant 7 jours a provoqué une diminution de la teneur hépatique en glutathion (**Deepmala et al., 2013**), L'un des effets malfaisants d'action du LPS dans le corps est d'induire la formation des espèces oxygénées réactives (ROS) ainsi que l'augmentation de la peroxydation lipidique dans les cellules (**Das et al., 2000**), Les radicaux libres et les produits intermédiaires de la peroxydation lipidique sont capables d'endommager l'intégrité et changer la fonction des biomembranes qui peut mener au développement de beaucoup de processus pathologiques (**Das et al., 2004**).

Le GSH est un tri peptide qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant (**Masella et al., 2005**).

LPS se lie exclusivement au pol (-SH) du GSH chargé à son inactivation ce qui favorise la peroxydation lipidiques et l'apparition des radicaux libres, qui augmente la susceptibilité des lésions tissulaires importantes dans les différents tissus (**Pari et parath, 2008**), ce qui confirme les observations de l'histologie hépatique des rats traités au LPS .on observés aussi une baisse dans les concentrations de GSH suivant le traitement au LPS.

Les cellules possède d'autres systèmes de défense antioxydant incluent des enzymes comme le SOD. Nos résultats montrent une diminution claire de l'activité de cette enzyme dans le foie chez les rats traités par LPS en comparant aux témoins. La diminution de l'activité de SOD, le chef de fil des défenses anti oxydantes au niveau cellulaire.

La SOD permet de convertir l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (Toxique). A défaut de cette réaction H_2O_2 va réagir avec les ions fer et générer des réactifs hautement toxiques pour les acides nucléique des cellules (formation du radical libre le plus puissant, OH°). ce dernier doit être détoxifier par la glutathion peroxydase, qui peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en présence du glutathion et permettre également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaine en réduisant les peroxydes instables en acides gras hydroxylés.

Les niveaux de cet antioxydant peuvent fournir une indication claire sur l'ampleur de dégâts cytotoxique qui se produit dans plusieurs tissus (**Sies, 1993**), D'autre part, la diminution des activités d' enzyme antioxydant peut être due directement à action du LPS en se liant au site actif d' enzyme ou cotisation à leur usage augmenté d'ébouer des radicaux libres induit par LPS donc causer l'inhibition irrévocable dans leur activité . D'autre part, LPS a été rapporté pour déclencher la production d'oxyde nitrique (**Gupta et al., 2000 ; Joshi et al., 2014**). Qui est connu pour empêcher l'activité des enzymes anti oxydantes en liant a son groupe prosthétique. Ces effets mènent probablement à l'accumulation de H_2O_2 qui réagit avec du O_2 et produire de OH^- , un initiateur de la peroxydation de lipide (**Chakrabarti et Bai, 1999 ; Huang et al., 2001 ; Chen et al., 2003**).

L'augmentation observée du taux du glutathion hépatique et l'activité d' enzyme antioxydante (SOD) dans le foie suivant l'administration du diclofenac ou la lectine par rapport aux rats traités par LPS, pourrait être à cause de sa propriété pour induire des metallothionèines (protéine riche SH) qui joue un rôle d'un chagnard des radicaux libres (**viarengo et al., 2000 ; youschida et al., 2005**). Ou son action indirect à réduire les niveaux

des espèces réactives d'oxygène, qui est due dans la plupart du temps à sa haute affinité pour LPS, par conséquent résulter en stress oxydant réduit (Sidhu, 2004 ; Pari et Pasath, 2008).

La lectine semble réduire la toxicité de LPS probablement par la formation d'un complexe avec LPS. Les mécanismes de ces interactions sont encore peu connus. La littérature rapporte que les LPS se lient à la lectine pour former un composé biologiquement inactif et la toxicité de ce complexe est très faible. Chez les rats traités par LPS, le LPS est probablement un produit qui a une très forte inhibition sur un grand nombre d'enzymes antioxydantes ayant des groupements fonctionnels thiols (SH), ce qui changerait la conformation de l'enzyme et l'inactiverait. Encore une fois, l'addition de lectine restaure les propriétés des enzymes touchées par LPS, probablement en se complexant avec LPS.

Dans la présente étude le taux hépatique et plasmatique de MDA chez les rats traités par le LPS est significativement augmenté par rapport aux rats témoins. La concentration élevée de MDA est un indice qui suggère qu'il y a une forte peroxydation lipidique au niveau du sérum, du foie et des reins suite à l'injection de LPS, cette augmentation de la concentration du MDA, peut être due à la diminution des antioxydants enzymatique et non enzymatique, comme l'acide ascorbique et le tocophérol qui jouent un rôle coopératif très importants dans l'inhibition du phénomène de la peroxydation lipidique et la formation de ses produits dangereux au niveau cellulaire (Vertuani *et al.*, 2004).

plusieurs études antérieures ont signalé la peroxydation lipidique accrue dans de nombreux tissus (y compris le foie, cœur, cerveau, intestin grêle et l'estomac) des rats (Omar *et al.*, 2013), Dans des conditions de stress oxydatif

Le traitement avec la lectine ou diclofénac réduit les concentrations en substances réactives à l'acide thiobarbiturique plasmatique et hépatique. Ces résultats sont probablement due à une inhibition de la génération des radicaux libres oxygénés, secondaire à la stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes.

6. Influence du traitement sur les variations histologiques

6.1. Résultats

➤ *Au niveau du foie*

L'histologie du foie d'un rat du lot témoin (fig.22.A) montre des cellules hépatiques normales, un cytoplasme granuleux et préservé avec veine centrale clairement visible. Chez les lots traités par lectine ou diclofenac (fig. 22. B, C,), l'histologie du foie montre qu'il a une structure presque normale. Pour le lot des rats traités par LPS (fig.22. D,E) on note une altération sévère de l'architecture du foie avec veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irrégulières ballonnées, inflammation et nécrose. Alors que pour les lots traités au LPS et traités par lectine ou diclofenac (fig.22.F,G), des congestions vasculaires avec veine centrolobulaire dilatée ont été notées mais en générale l'architecture semble intacte.

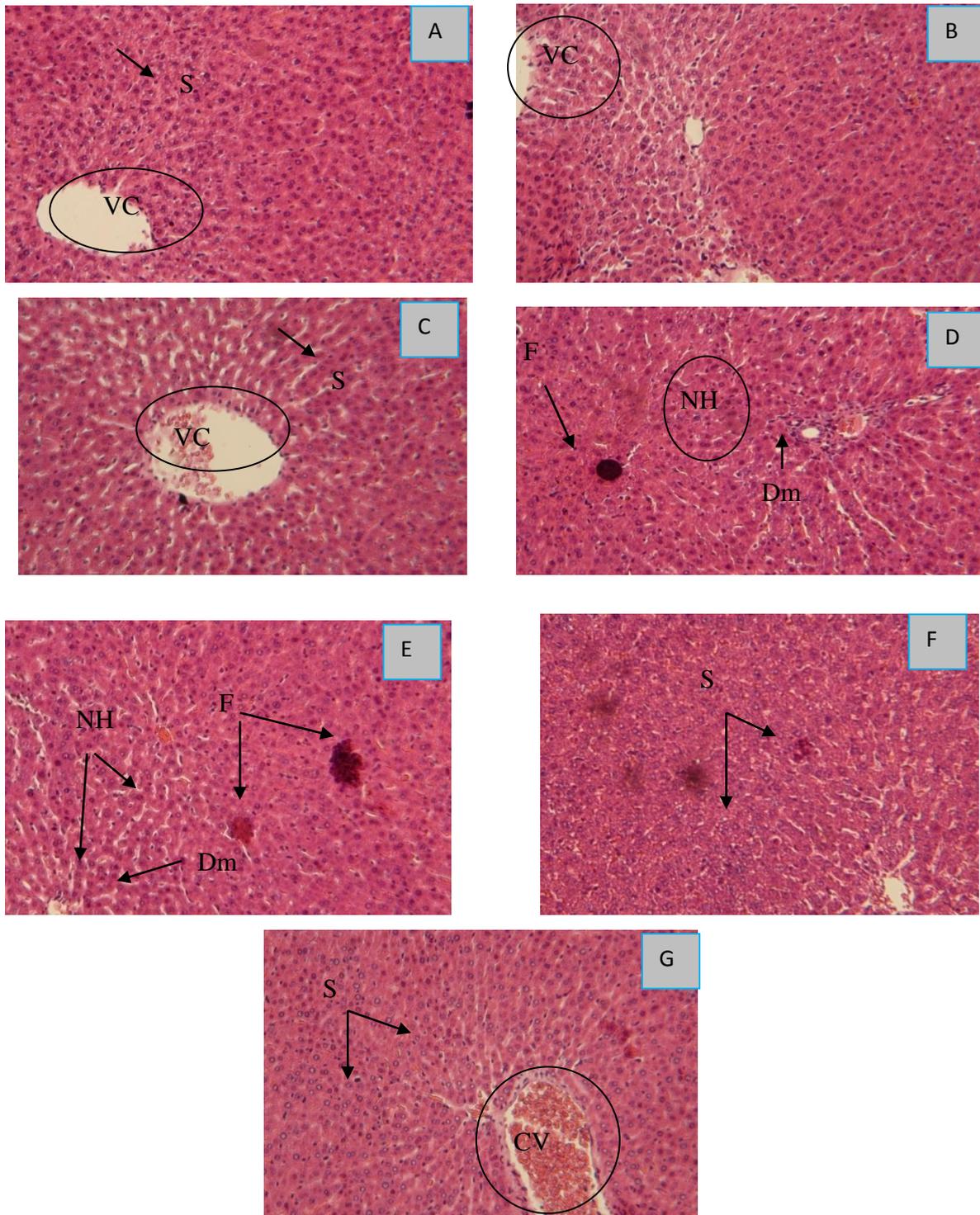


Figure.22 : les coupes histologiques du foie du rat témoin (A) et traités par Lectine(B), Diclofenac(C), LPS (D, E), L/LPS (F) et D/LPS (G) après 7 jours de traitement. Coloration à l'hématéine –éosine. (X100).

S : Sinusoides, **Dm** : destruction membranaire, **NH** : Nécrose hépatocytaire, **F** : fibrone

6.2. Discussion

Ainsi, l'observation des coupes histologiques que nous avons réalisées révèle que la toxicité du LPS s'est manifestée par des atteintes tissulaires sans équivoque, au niveau du foie. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques (**Milton et al., 2011**).

De nombreuses recherches ont démontré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (**Thevenod, 2003**). En effet, ces radicaux peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules. L'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) permet la transmission du caractère radicalaire et déclenche ainsi des pathologies sévères allant jusqu'à la mort des animaux.

Il a été signalé que l'exposition subchronique par IP du LPS entraîne de multiples nécroses au niveau du reins associé à des changements de l'ultra-structure et des altérations rénale (**Necib et al., 2016**).

D'autres études réalisées par **Omar et al. (2013)**, Sur l'Effet de *Cannabis sativa* sur le stress oxydatif après l'administration de LPS chez la souris ont montrées des dommages histologiques accrue au niveaux des hépatocytes caractérisé par une nécrose des cellules hépatiques et infiltration de cellules mononucléées, centrilobularnecrosis et la congestion de la veine centrale et une légère Congestion dans les sinusoides et minuscules foyers, Aussi, les examens histopathologiques ont révélé circinée chromatine dans certains noyaux et des cellules géantes. On a observé vacuolisation cytoplasmique et modifications graisseuses des hépatocytes avec dilatation sinusoidale et congestion.

Bien que le modèle lamellaire d'hépatocytes a été restauré à presque normal chez le lot traité par la lectine ou diclofenac, ce peut être attribué à la capacité du lectine et diclofenac à réduire la menace des radicaux oxygénés ce qui mène à la réduction des changements pathologiques.

D'après les résultats actuels, on peut conclure que l'utilisation de lectine purifier a partir de la plante *Ephedra alata* et le diclofenac ont la capacité à améliorer la plupart des effets nocifs induite par LPS.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

A notre connaissance, cette étude a été la première à évaluer l'effet anti-inflammatoire du lectine partiellement purifié de la plante *Ephedra alata* sur la cytotoxicité induite par le LPS in vivo.

L'injection intrapéritoniale du LPS aux rats pendant 7 jours a provoqué une perturbation métabolique révélée par l'apparition des atteintes de la fonction hépatique. Cette perturbation est associée à une altération structurale du foie. De plus, le statut antioxydant a été affecté, suggérant ainsi un stress oxydant généré par le LPS, qui a troublé la capacité défensive de l'organisme. L'association du lectine avec le LPS a fait diminuer le niveau de la toxicité.

Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants :

- Diminution du poids corporel et Augmentation des poids relatifs de foie durant la période de traitement par LPS ; Une action protectrice semblable du diclofenac ou lectine à améliorer le poids corporel des animaux traités au LPS.
- Une perturbation du métabolisme biochimique après le traitement par LPS a été révélée par l'augmentation de l'activité enzymatique des : ASAT, ALAT, CRP et PAL. La supplémentation du lectine a considérablement réduit cette perturbation, ceci montre son effet protecteur.
- Le dosage des biomarqueurs du stress oxydant (GSH, MDA, SOD) et des enzymes antioxydantes (DPPH, VIT C) a permis une meilleure caractérisation de l'effet antioxydant du lectine vis-à-vis la toxicité du LPS.
- Une altération structurale du tissu hépatique a été observée après le traitement des rats par LPS. Le lectine en association avec LPS a protégé la structure tissulaire des organes, ce qui peut certifier l'effet protecteur du lectine.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'action protectrice du lectine et sa capacité à moduler les effets toxiques causés par LPS.

*Références
bibliographiques*

- A**bourashed EA, El Alfy AT, Khan IA, Walker L.(2003). *Ephedra* in perspective—a current review. *Phytother. RES.* 17, 703-712.
- Abuja PM, Albertini R.** (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.* 306, 1-17.
- AL-Qarawi AA, Abd Allah EF, Abeer H.** (2011). *Ephedra alata* as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research.* 5 (16), 2297-2303.
- Al-Qarawi AA, Abd Allah EF, Hashem A.** (2012). Effect of *Ephedra alata* on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus* . *Pak. J. Bot.*, Vol. 44 (1), 425-428.
- Aouacheri W. S , Saka R , Djafer G.** (2009). Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez le rat. *Ann Biol Clin .* 67 (6) , 619-27.
- Assreury AMS.** (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation.* 6, 201-210.
- Azevedo C, et al.** (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* 6(8), 354-8.
- B**abosa T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95 (5), 673-678.
- Banwell JG.** (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial over growth in the rat. *Gastroenrology.* 84, 506-515.
- Baskin SI, Salem H.** (1994). Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. *Academic press Inc.*363, pp 25-62.
- Barnes Peter J.** (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science.* 94, 557-572.
- Barouki R.** (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* n°3, 22, 266-72.
- Barton GM.** (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 118, 413-420.
- Beaudeau JL, Delattre J, Peynet J.** (2003). Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-Sciences Flammarion, Paris. pp 91-107.
- Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, et al.** (2006). Phenolic-extract from argan oil

(*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Athero.* 184, 389–396.

Blain, Jouzeau, Netter, Jeandel. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Méd Interne.* 21, 978-988.

Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann Biol Clin.* 59(4), 453-459.

Bothan MB, Weil KR. (2011) Biochimie de harper. 4ème édition. *DE BOECK.* 510.

Boyd WC, Shapleigh E. (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins lectins. *Science.* 119- 419.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sanvaigo. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat.* 424, 9-21.

Chakrabarti SK, Bai CJ. (1999). Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. *Bioch Pharm.* 58(9), 1501-1510.

Chen D, Diao L and Eulenstein O. (2003). Flipping: A supertree construction method. In Janowitz, M., Lapoint, F.J., McMorris, F.R., Roberts, F.S., eds. *Bioconsensus*. Vol. 61 of *DI-MACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science*. American Mathematical Society. p. 135–60.

Das KK, Dasgupta S. (2000). Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction. *Biol Trace Elem Res.* 73(2), 175-180.

Das KK, Das SN. (2004). Studies on the role of ascorbic acid on nickel induced hepatic nucleic acid concentration in rat. *Basic Clin Physiol Pharmacol.* 15, 185-195.

Deepmala J, Deepak M, Srivastav S, Sangeeta S, Kumar SA, Kumar SS. (2013). Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protects acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 27(3), 249-56.

Delattre J. (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris – new york. p :620.

Derbel S, Touzard B, Triki MA, Chaieb M. (2010). Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora.* 205, 471–474.

Drickamer K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Biol Chem.* 263, 9557-60.

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine Gvozdzakova A (ed) pp 19-43.

Essig DA and Nosek TM. (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can J Appl Physiol.* 22, 409-428.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med.* 13, 341 - 349.

Favier A. (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin.* 55 (1), 9 - 16.

Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'act Chim.* 108 - 115.

Gabius HJ, Springer WR, Barondes SH. (1985). Receptor for the cell binding site of discoidin I. *Cell.* 42, 449-456.

Galan P, Preziosi P, Triol I. (1997). Antioxydant et prevention cahiers de nutrition et de diététique. 359-370.

Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H. (2007). Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free Rad Res.* 41, 251-9.

Ghourri M, Zidane L, Douira A. (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences.* 17, 2388-2411.

GIANLUCA C. (2006). Etude structure-fonction des glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques Biomolécules. Université de Joseph-Fourier - Grenoble I. France, . Pp: 15-39.

Goldstein IJ, Poretz RD. (1986). isolation, physicochemical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins in Liener. I. E., Sharon. N., Goldstein. I. J. The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. *Academic Press Orlando.* 35-229.

Gomes JC. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparaison with concanavalin A. *Agent Action.* 41, 132-135.

GREER F, BREWER AC, PUSZTAI A. (1985). Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Brit. J. Nutr.* 54, 95 -103.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA& Koopmans SJ. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.*11, 1045-1056.

Guillot J, Guerry M, Kanska G, Caldefie-Chezet F, DE Latour M, Penault-Llorca F. (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer.* 91, 141-158.

Guillot J, Kanska G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochem. System. Eco.* 25, 203- 230.

Gupta S, Ahmad N, Husain MM, Srivastava RC. (2000). Involvement of nitric oxide in nickel-induced hyperglycemia in rats. *Nit Ox.* 4, 129-138.

Gutteridge J. (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm.* 19, 598-620.

Halliwell B et Gutteridge, JMC. (2007). Free radicals in biology and medicine oxford university press. 20-31.

Hirabayashi J. (2004). Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj.* 21, 35-40.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nat.* 421(6919), 182-187.

Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC, Epstein CJ. (2001). Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med.* 31, 1101-1110.

Hussein S.A, Omya A, Abou zeid R, Afaf D, Abdel mageid, Eman A.(2014) Ameliorating role of curcumin on oxidative stress induced by endotoxemia in rats.

Imberty A, Mitchell EP, Wimmerová M. (2005). Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 525 534.

IRAZ M , IRAZ m , Mukaddes E, ŞREFOĞL U. (2015). Protective effect of β -glucan on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences.* 45, 261-267.

Jaffe WG. (1980). hemagglutinins (Lectins). In toxic constituents of plant foodstuffs. New-York, Academic Press. p: 502.

Jain D, Kaur KJ, Salunke DM. (2001). Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys.* 80, 2912- 2921.

Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG. (2007). Diabetes and Oxidant Stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective. Holtzman J.L (ed) pp123-160.

Jeyaprakash AA, Katiyar S, Swaminathan CP, Sekar K, Surolia A. (2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *Mol Biol.* 332, 217-228.

Joshi D, Mittal D K, Shukla S, Srivastava A K, Srivastava S K. (2014). N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: A histopathological approach. *J of Trace Elem in Med and Biol.* 28, 218–226.

Kagi JHR. (1993). Evolution , structure and chemical activity of class 1 metallothioneins: an overview, in: Suzuki, KT, Imura, N, Kimura, M. (Eds), Metallothionein III: Biological roles and medical implications, Birkhauser verlag, Berlin.29-56.

Kaplowitz NT, Okhtens M. (1985). The regulation of the hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 25, 715-744.

Karolina N., Anna G., Krystyna G. (2013). Goembiowska LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum , *Pharmacological Reports.* 65, 863 -869.

Kehrer JP. (1993). Free radcals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Review in Toxicol.* 23 (1), 21-48.

Kocourek J, Horejsi V. (1981). Defining a lectin. *Nature.* 290-188.

Kulkarni GV. (1998). Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell.Research.* 245, 170-178.

Lazo JS, Pitt BR. (1995). Mettalothionein and cell, death by anticancer drug. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 655-677.

Lee KJ and Dabrowski K. (2003). Interaction of vitamin C and E in yellow perch (*Perca flavescens*) nutrition and reproduction. *Br J Nutr.* Vol. 89, 589-596. activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Mol.* 13, 581-594.

Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse méd.* 30, 1076-1081.

Lenka s, Imberty A, Jaroslav k. (2006). Modelisation moleculaire des lectines et des glycosyltransferases. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université joseph fourier. Universite grenoble i – joseph fourier.

Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 790-796.

Liener I, Sharon N, Goldstein J. (1986). The lectins Properties. Functions and Applications in biologieand medicine. Academic Press INC. London LID. 13-24.

Lis H, Sharon N. (1986). In I. E. Liener, N. Sharon, and I.J. Goldstein (ed.), the lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, Inc., Orlando, Fla. *Application of lectins.* 293- 370.

Lis H, Sharon N. (1998). Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **98**, 673-674.

Lopez S. (2003). Anti-humain immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from Narcissus species. *Planta medica.* 69 (2), 109-112.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. (1998). Legume lectin structure. *Biochim Biophys Act.*1383, 9-36.

Marnett LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat Res.* 424, 83-95.

Martínez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Bioch.* 77, 147-161.

Masella BA, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannimi C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *Nutr Biochem.* 16, 577-586.

Milbury PE. et Richer AC. (2008). Understanding the Antioxidant Controversy; Ed: PRAEGER; p: 81-100.

Milton- Prabua S, Shagirthab K, Renugadevia,J. (2011). Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomed & Prev Nut.* 1, 1–7.

Miossec P.(2003). Physiopathology of inflammation.*La Revue du praticien.* **53 (5).**

Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378.

Mukherjee S, Zheng H, Derebe MG, Callenberg KM, Partch CL, Rollins D, Propher DC, Jiang QX. (2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*. 505, 103–107.

Murdock LL, Shade RE. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food. Chem.* 50 (22), 6605-661.

Nachbar MS, Oppenheim JD. (1980). Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33, 2238 -2345.

Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat.* 424, 59-69.

Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*. 420, 846-852.

Nawwar MAM, El-Sissi HI, Barakat HH. (1984). Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*. 23(12), 2937-2939.

Necib Y and Bahi A. (2016). Anti-inflammatory activity of lectin purified from *morus nigra* against lipopolysaccharide (lps) induced renal stress in rats. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5, 39-53.

Nicolas Jean-François, Florence Cousin, Jean Thivolet. (2001). Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John Libbey Eurotext*. 2001, 55-58.

NIKAIDO H, VAARA M. (1987). Outer membrane In *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium : cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology* : 24, 7-22.

Omar m.e, abdel-salam, safaa m, Youssef m, amany a., Sleem. (2011). the effect of different antidepressant drugs on oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice. *Excli journal*. 10, 290-302.

Omar M. E. Abdel-Salam, Somaia A., Nada Neveen A., Marawa El-Sayed, El-Shamarka ,Enayat Omara, (2013). Effect of Cannabis sativa on oxidative stress and organ damage after systemic endotoxin administration in mice. ·

Ould El Hadj MD, Hadj-Mahammed M, Zabeirou H. (2003). place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d’Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3, 47-51.

Ozenda P. (1991). Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). 662.

Packer T, Ritschler HJ, Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378.

Pari L, Parasath A. (2008). Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Biochem Biotech.* 173, 77-8.

Peumans W J, Van Damme EJ. (1995). Lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347-352.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaiss Coeur Poumons.* 4(5), 359-370.

Piquet M A. et Hébuterne X. (2007). Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN ; p: 16-20.

Poiroux G. (2011). Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. Biologie cellulaire et Biochimie. Toulouse. Université Toulouse III - *Paul Sabatier*. Pp, 35-50.

Pontet M. (1996). Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines animales: les galectines. *Immunoanal.Biol. Spéc.* 11, 297-305.

Prior RL, Cao G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparaison of different analytical methods. *Free radic Biol Med.* 27, (11-12): 1173-1181.

Rajagopal K, Sasikala K. (2008). Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore Med J.* 49 (2), 137 - 142.

Renato DEA, Moreira. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, *Rio de Janeiro.* 86, 211-218.

Sen CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exer.* 33 (3), 368-370.

Sharon N, Lis H. (1990). Legume lectins-a large family of homologous proteins. *FASEB Journal.* 4, 3198-3208.

Sharon N, Lis H. (2004). History of lectin : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14, 53R-62R : 11.

Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK. (2004b). role of zinc in regulating the levels of hepatic elements following nickel toxicity in rats. *Biol Trace Elem Res.* 102, 161-172.

Sies H. (1993). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer J of Med.* 91, 31S-38S.

Simonian N A, Coyle JT. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann review of Pharmacol and Toxicol.* 36, 83-106.

Singh PK, et al. (2012). Plasmodium falciparum Prp16 homologue and its role in splicing. *Biochim Biophys Acta.* 1819(11-12), 1186-99.

Singh U, Devaraj S and Jialal I. (2005). Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med.* 33 (5), 575-586.

Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Ren a Biol.* 327, 649-662.

Stevnsner T, Tharslund T, De souza-pinto NC, Bohr VA. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol.* 37, 1189-1196.

SZALO I.M., TAMINIAU B., MAINIL J. (2006). Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* :structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vét.,* , **150**, 108-124.

Tanne A, Neyrolles O. (2010). C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence.* 1, 285–290.

Tastekin D, Atasever M, Adigüzel G, Keles M , Tastekin A (2006). Hypoglycaemic effect of Artemisia herba-alba in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy,* 50, 235-238.

Thevenod F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.* 93, 87-93.

Trent M.S., Stead C.M., Tran A.X., Hankins J.V.(2010). Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J. Endotoxin Res.* 12, 205–223.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemicobiol inter.* 160, 1-40.

Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. (2004). The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* Vol 10, 1677-1694.

Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panifili I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol.* 46, 407-417.

Wang LC, Kang L, Hu TM, Wang JL. (2004). Abrin-a A chain expressed as soluble form in *Escherichia coli* from a PCR-synthesized gene is catalytically and functionally active. *Biochimie.* 86, 327-333.

Wang H, Ng TG. (1998). Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication.* 253, 143-146.

Welch WJ. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72, 1063-1081.

Wright CS. (1980). Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *Mol Biol.* 141, 267-291.

Wu AM, Sugii S, Herp A. (1988). A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 228, 819-847.

Xu S, Wang L, Wang X W, Zhao YR, Bi WJ, Zhao XF, Wang JX. (2014). L-type lectin from the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 397-405.

Youshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S. (2005). Measurement of radical scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicol.* 213, 74-80.

Yue KD, McLennan S, McGill E, Fisher E, Hefferman C C and Turtle JR. (1990). Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control : differences between diabetic patients and diabetic rats. *Diabetics Res Clin Pract.* 9(3), 239-44.

Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol & Med.* 33, 337-349.

Zhang H, Peatman E, Liu H, Feng T, Chen L, Liu Z. (2012). Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 598-608.

Annexes

Annexe 01

1. Dosage des paramètres biochimiques

1.1 Dosage de Malondialdéhyde (MDA) plasmatique

Le dosage est basé sur les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 100µl de plasma
- ✚ Ajouter 750µl d'une solution du TBA (0.55mM)
- ✚ Mélanger et ensuite placé pendant une heure au bain marie à 90°C.
- ✚ Ajouter 2ml de butanol pendant 2minutes sous agitation
- ✚ Centrifuger à 3000rpm pendant 10min à 4°C.
- ✚ Lire l'absorbance à une longueur d'onde **532nm**

2. Evaluation de la capacité antioxydante plasmatique

2.1 Dosage de la vitamine C

Le dosage est basé sur les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 200 µl de plasma
- ✚ Ajouter 800 µl d'une solution TCA (10 %)
- ✚ Incubation 5 min et ensuite Centrifuger à 3000 tours/min pendant 5 min
- ✚ Récupérer 500 µl de surnageant
- ✚ Ajouter 2ml de l'eau distillé
- ✚ Ajouter 200 µl de réactif de folin (1/10)
- ✚ Après 10 min lire l'absorbance à **760 nm**

2.2 Dosage de radical DPPH in vivo

Brièvement, un volume de 50 μ L de plasma est additionné à 950 μ l de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (Janaszewska et Bartosz, 2002), l'absorbance à 517 est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé.

3. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire

3.1 Dosage de GSH

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2- nitro-5- marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque par les groupements (-SH) du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- ✚ Prélever 0.8 ml de l'homogénat
- ✚ 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- ✚ Agiter et laisser pendant 15 minutes
- ✚ Centrifuger a 1000 tours /min pendant 5min
- ✚ Prélever 0.5ml du surnageant
- ✚ Ajouter 1 ml du tampon PBS (0.1 M, pH 7.4)
- ✚ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M
- ✚ Laisser pendant 5min à une température ambiante et lire les densités optiques à **412 nm** contre le blanc réactif

3.2 Dosage de SOD

La procédure expérimentale du dosage du superoxyde dismutase est la suivante :

- ✚ Ajouter 0.8922ml de tampon phosphate (50mM, pH=7.8).
- ✚ Ajouter 0.05ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 0.0852ml de NBT (2.64mM). Ajouter 0.0226ml de riboflavine (0.26mM)
- ✚ La réduction du NBT est estimée après 20min à une longueur d'onde **580nm** contre le blanc.

3.3 Dosage de Malondialdéhyde (MDA)

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 532 nm.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante

- ✚ Prélever 100µl de homogénat
- ✚ Ajouter 750µl d'une solution contenant du TBA
- ✚ Mélanger et ensuite placé pendant une heure au bain marie à 95°C.
- ✚ Ajouter 2ml de butanol pendant 2minutes sous agitation
- ✚ Centrifuger à 3500rpm pendant 10min à 4°C.
- ✚ Lire l'absorbance à une longueur d'onde **532nm**

3.4 Dosage des protéines tissulaire

Mode opératoire

- ✚ Prélever 0.1ml de l'homogénat.
- ✚ Ajouter 5ml du réactif coloré (BBC).
- ✚ Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- ✚ Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595 nm contre le blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 → 1mg/ml de sérum albumine de bovin)

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Réactif de Bradford

- Bleu de coomassie.....0.1g

- Ethanol (95%).....50ml

Agitation pendant deux heures (agitation magnétique) puis ajouté

→ Acide orthophosphorique (85%)

→ Eau distillée.....qsp 1000 ml

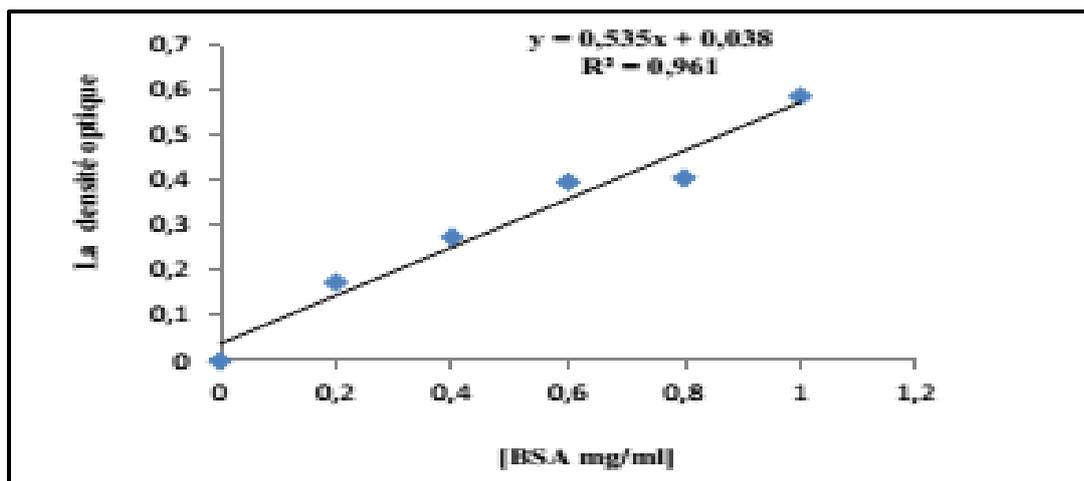
Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines

-BSA.....1g

- Eau distillée.....qsq1000ml

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BC (ml)	5	5	5	5	5	5



Concentration en protéines (mg/ml)

Droite d'étalonnage du sérum albumine bovine

Annexe 2

L'étude histologique

Des fragments de foie de chaque rat sont retirés du Bouin alcoolique (26ml Formol, 7ml Acide acétique, 45ml Acide picrique 1% dans l'éthanol à 95% et 22ml Eau distillée) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2cm² et une épaisseur de 1.5mm.

Les prélèvements réalisés sont mis dans des cassettes spéciales tournées afin de permettre le passage des liquides

Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spéciaux.

Inclusion

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

Coupes et coloration

Les blocs d'inclusions sont collés sur un porte-échantillon, la surface à coller est ramollie au moyen d'une lame métallique chauffée modérément à la flamme, puis posée sur le porte-objet sur lequel le bloc adhère très bien après une légère pression. Les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces coupes sont étalées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée. Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2

ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique) selon les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée
- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées), déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme)
- Enfin déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet

Année universitaire : 2015/2016

présenté par : KHENIOUA NOUR EI HOUDA
NABTI AMINA

Effet hépato-protecteur d'une lectine purifiée à partir de la plante *Ephedra alata* sur l'inflammation induite par LPS .

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en :
Biochimie/Analyse Protéomique et Santé

L'étude visait à évaluer le rôle hépato-protecteur possible de lectine partiellement purifiée de la plante *Ephedra alata* sur l'inflammation induite par le lipopolysaccharide chez le rat , en utilisant des approches biochimiques. Les effets de la lectine d'*Ephedra alata* sur le stress oxydatif induit par LPS ont été évalués par les niveaux de la peroxydation lipidique hépatique et niveaux GSH, activités SOD, et des paramètres de la capacité anti-oxydante plasmatique : DPPH et vitamine C .

A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable de poids Corporel des rats contaminés au LPS et une augmentation du poids absolu et relatif du foie

Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques Caractérisés surtout, par une augmentation de la concentration plasmatique du CRP, les transaminases et PAL sérique chez les rats contaminés par LPS par rapport aux animaux témoins. Alors que, LPS a aussi induit un stress oxydatif, comme l'indiquent par la diminution de GSH, SOD, ainsi que de l'augmentation du niveau de la peroxydation lipidique. les paramètres anti-oxydantes DPPH, vitamine c ont diminué ; L'addition combinée de lectine et Diclofenac a amélioré les paramètres biochimiques et surtout celle de la fonction hépatique.

Aussi, les résultats ont montré clairement des altérations de structures des tissus étudiés en comparaison avec les témoins, avec veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irrégulières, inflammation et nécrose hépatique. Alors que pour les lots traités au LPS et traités par lectine ou diclofenac des congestions vasculaires avec veine centrolobulaire dilatée ont été notées mais en générale l'architecture semble intacte.

En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition au LPS a des effets toxiques sur les paramètres mentionnés précédemment, la supplémentation de lectine et diclofenac combinée à améliorer certains paramètres et diminuer les altérations histologiques par la protection contre les effets toxiques du LPS.

Mots clés : lipopolysaccharide, stress oxydant, *Ephedra alata*, inflammation, le foie.

Laboratoire de recherche : laboratoire de BIOCHIMIE université frères mentouri
-Constantine-

Jury d'évaluation :

Président: MECHAKRA A. (Pr) Université des Frères Mentouri Constantine
Rapporteur: NECIB Y. (Pr) Université des Frères Mentouri Constantine
Examineur: BAHY A. (M.A) Université des Frères Mentouri Constantine

Soutenu le : 05/06 /2016

